

# 薬物と化粧品有効成分の皮膚透過挙動 を用いた皮膚中濃度予測に関する研究

押坂 勇志



## 目次

記号と略号	1
緒言	2
第1章 皮膚透過パラメータを用いた皮膚中平均濃度の予測	5
第1節 1層膜および2層膜モデルを用いた皮膚透過性および皮膚中平均濃度予測における理論	6
1.1. 1層膜モデル皮膚中平均濃度予測	6
1.2. 2層膜モデル皮膚中平均濃度予測	8
1.3. 1層膜透過パラメータの解析方法	9
1.4. 2層膜透過パラメータの解析方法	10
第2節 実験方法	13
2.1. 試薬	13
2.2. 実験動物	14
2.3. 膜透過実験	14
2.4. シリコーン膜およびヘアレスラット皮膚からの化学物質の抽出率測定方法	15
2.5. シリコーン膜およびヘアレスラット皮膚中濃度の測定方法	16
2.6. 分析方法	17
2.7. 統計解析	18
第3節 結果・考察	19

3.1. シリコン膜中濃度	19
3.2. 膜透過と膜中濃度:シリコン膜と動物皮膚の比較	23
3.3. 2層膜モデルを用いた皮膚中化学物質濃度シミュレーション	27
第4節 小括	32

## 第2章 皮膚透過パラメータを用いた皮膚各深度における濃度の予測 33

第1節 2層膜モデルを用いた皮膚各深度における濃度予測の理論	34
第2節 実験方法	35
2.1. 試薬	35
2.2. 皮膚材料	35
2.3. 皮膚透過実験	35
2.4. 角層および生きた表皮・真皮各深度における濃度の測定方法	36
2.5. 分析方法	37
第3節 結果・考察	39
第4節 小括	45

## 第3章 単純な Fick の拡散則では説明がつかない化学物質の皮膚透過

パラメータと皮膚中濃度の予測	46
第1節 皮膚透過の方向依存性における理論	48
第2節 実験方法	52
2.1. 試薬	52
2.2. 実験動物およびヒト皮膚材料	52
2.3. 皮膚透過実験	53

2.4. 分析方法 . . . . .	54
2.5. 皮膚凍結切片 . . . . .	55
第 3 節 結果・考察 . . . . .	56
第 4 節 小括 . . . . .	72
結論 . . . . .	73
謝辞 . . . . .	77
引用文献 . . . . .	78

略号		$K_{ved}$	生きた表皮・真皮/基剤間の分配係数
HBA	4-Hydroxy benzoic acid		
MP	Methyl paraben	$K_w$	水の角層-表皮細胞間分配係数
EP	Ethyl paraben		
PP	Propyl paraben	$D$ (cm <sup>2</sup> /s)	膜中拡散係数
BP	Butyl paraben	$D/L^2$ (s <sup>-1</sup> )	拡散パラメータ
PeP	Pentyl paraben	$D_w$ (cm <sup>2</sup> /s)	水の角層内での拡散定数
ISMN	Isosorbide-5-nitrate	$L, x$ (cm)	バリアの厚み
FD-4	Fluorescein isothiocyanate-dextran (M.W.: 4400)	$L_{sc}$ (cm)	角層の厚み
		$L_{ved}$ (cm)	生きた表皮・真皮の厚み
		$t$ (h)	時間
LID (・HCl)	Lidocaine hydrochloride	$P$ (cm/s)	透過係数
MC (・HCl)	Mepivacaine hydrochloride	$P_{tot}$ (cm/s)	全層皮膚透過係数
EtOH	Ethanol	$P_{sc}$ (cm/s)	角層透過係数
DFP	Diisopropyl fluorophosphate	$P_{ved}$ (cm/s)	生きた表皮・真皮透過係数
TCA	Trichloroacetic acid	$R_{tot}$ (Ω)	全層透過抵抗
PBS	Phosphate buffered saline	$R_{sc}$ (Ω)	角層透過抵抗
HPLC	High performance liquid chromatography	$R_{ved}$ (Ω)	生きた表皮・真皮透過抵抗
		$Q$ (μg/cm <sup>2</sup> )	累積透過量
LC/MS/MS	Liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry	$J$ (μg/cm <sup>2</sup> /h)	膜透過速度
記号		$TEWL$	経表皮水分損失
$C$ (μg/mL)	濃度	$M_{tot}$ (μg)	全層皮膚中化学物質質量
$C_v$ (μg/mL)	基剤中濃度	$M_{sc}$ (μg)	角層中化学物質質量
$C_{ss}$ (μg/mL)	皮膚透過が定常状態時の皮膚中濃度	$M_{ved}$ (μg)	生きた表皮・真皮中化学物質質量
$C_{sc,ss}$ (μg/mL)	皮膚透過が定常状態時の角層中濃度	$I.C.$	初期条件
		$B.C.$	境界条件
$C_{ved,ss}$ (μg/mL)	皮膚透過が定常状態時の生きた表皮・真皮中濃度		

$K$	膜/基剤間の分配係数	
$KL$	分配パラメータ	
$K_{sc}$	角層/基剤間の分配係数	

## 緒言

1960 年以降、物理薬剤学に加えて生物薬剤学の概念が発達・普及したことにより、皮膚適用した化学物質の吸収に関する物理的および生物的特性が明らかになり、皮膚は全身作用を目的とした化学物質の投与部位の 1 つとして注目されるようになった。1980 年代になると TTS (Transdermal Therapeutic System、経皮吸収治療システム) と呼ばれる、ニトログリセリンのような全身作用を目的とした薬物を含有した皮膚適用製剤が開発されるようになり、TTS に含有される薬物の種類は現在までに 20 種程度までになった。一方、皮膚局所で作用する外用医薬品についても、第 2 世代のパップ剤が大きな市場を占めるようになった。また、外用医薬品だけでなく、機能性を持たせた化粧品開発も増加の一途をたどっている。それらに伴い、皮膚局所での有効性・安全性評価をするために、化学物質の皮膚中濃度の測定が大変重要となってきた。

化学物質の効果や毒性の発現は直接反応と間接反応に大別される。直接反応は化学物質が作用部位のレセプター等に結合して直接効果を発現するもので、反応強度と作用部位濃度の関係は Hill 式で表すことができる<sup>1,2)</sup>。一方、間接反応は直接作用を有する化学物質の生成もしくは分解に係わる酵素等に、適用した化学物質が反応し、その結果生じる変化が効果に関わるモデルで、この場合も反応強度は化学物質の作用部位濃度の関数として示される。したがって、作用部位での化学物質濃度を正しく測定することは、化学物質の効果や毒性強度の正確な評価を可能とする。

化学物質が皮膚を介して体内に入るとき、その作用部位は大きく 2 つ、すなわち、適用部位から血液に移行して各部位で作用を発現する場合と、血液に移行せずに直接各部位で作用を発現する場合に分けられる。前者の場合、化学物質は皮膚を介し

て吸収された後、血液によって作用部位に達する。そのため、化学物質の効果を考えるには、作用発現部位の濃度を知ることが重要ではあるが、その濃度は血中濃度で概ね代用することができる<sup>3-5)</sup>。また、皮膚適用した化学物質の血中濃度-時間プロファイルは、摘出皮膚を用いた *in vitro* 皮膚透過試験より得られる皮膚透過速度や透過係数等の皮膚透過パラメータより予測が可能である<sup>6-8)</sup>。このように、適用部位から血液に移行し、各部位で作用を発現する化学物質の効果は、その皮膚透過挙動や血中濃度測定が重要になる。

一方、後者の場合、たとえば皮膚局所の作用を期待した外用医薬品や化粧品に含まれる化学物質の主作用は、皮膚中濃度が重要となる。

また、皮膚適用する化学物質の安全性を評価する場合には、その両者共に、血中濃度および皮膚中濃度がそれぞれ全身性と局所性の有害作用と関係するため重要となる。

皮膚局所での化学物質の効果発現に関与する層(皮膚各深度)は多種多様であり、例えば、サンスクリーン剤や皮膚保護剤は皮膚表面の化学物質濃度が重要であり、抗菌剤、鎮痒剤、美白効果を有する機能性化粧品は生きた表皮や真皮中濃度が重要となる。したがって、皮膚局所での有効性・安全性を予測するには、皮膚全体の濃度ではなく、それぞれの作用発現部位での濃度測定が必要である。

これまで、皮膚中濃度は suction blister 法<sup>9)</sup>、punch and shave biopsies 法<sup>10)</sup>、tape-stripping 法<sup>11-13)</sup>等を用いて測定されてきた。しかし、ヒトを用いた *in vivo* での皮膚中濃度測定は倫理的に難しく、さらに製剤を完全に取り除く方法がないことや皮膚からの化学物質の抽出率が低い等の技術的な問題点もある。皮膚全体の濃度に比べて皮膚中各部分での濃度の測定はさらに困難であり、簡便な予測法の確立が望まれている。

近年、動物福祉の観点から動物実験に対する批判が高まり、欧州連合(EU)内では



EU 化粧品指令第 7 次改正によって、2009 年または 2013 年から動物実験を行った化粧品の製造・輸入が一部禁止されるといった流れがある<sup>14-16)</sup>。また、動物愛護法が改正施行され、3Rs (Reduction: of animal use, Refinement: to lessen pain or distress and to enhance animal well-being, Replacement: of an animal test with one that uses non-animal systems or phylo-genetically lower species) の徹底が行われている。こうした状況から、動物実験代替法に関する研究が広く行われ、動物実験代替法の確立が求められている。化学物質の皮膚透過に関しては、三次元培養ヒト皮膚モデルや人工膜を用いた皮膚透過性評価や *in silico* 法を用いた予測が行われている<sup>17-27)</sup>。一方で、皮膚中濃度に関しては代替膜を用いた皮膚中濃度予測や *in silico* 法を用いた予測はほとんど行われていない。

これらの多様な背景を勘案し、本研究では、Fick の拡散則を用いた解析法を中心として、簡便な皮膚中濃度 (concentration-distance profile) 予測方法について検討した。すなわち、第 1 章では、初めに、均一な 1 層膜であるシリコーン膜を用いて、化学物質の膜透過速度が定常状態時の膜中平均濃度を concentration-distance profile から予測した。次に皮膚を用いて皮膚中平均濃度を 1 層膜モデルもしくは角層と生きた表皮・真皮の 2 層膜モデルを用いて concentration-distance profile から予測した。さらに、シリコーン膜中濃度から皮膚中濃度の予測が可能であるか検討した。第 2 章では、皮膚各深度 (目的部位) における濃度を concentration-distance profile から予測可能であるか検討した。第 1 章、第 2 章では、比較的皮膚を通りやすいと考えられる物理化学的性質を持つ化学物質を選択し検討を行ったが、第 3 章の研究では、第 1 章、第 2 章の皮膚中濃度予測式がより広範囲の化学物質に利用であるか検討を行い、予測できない物理化学的性質を有する化学物質に関しては、その問題点を検討した。

## 第 1 章 皮膚透過パラメータを用いた皮膚中平均濃度の予測

適用部位から血液に移行し、各部位で作用を発現する化学物質の有効性評価には血中濃度が、化学物質の安全性評価には血中濃度および皮膚中濃度が重要となる。また、適用部位から血液に移行せずに直接各部位で作用を発現する化学物質の有効性評価には皮膚中濃度が、化学物質の安全性評価には血中濃度および皮膚中濃度が重要となる。

このように、外用医薬品や化粧品の有効性・安全性を評価するときには、皮膚透過性と皮膚中濃度の両方を測定する必要があると考えられる。皮膚局所作用性薬物や化粧品有効成分の中にはそれらの作用部位が皮膚組織にあるものが多い。これらの効能・効果を解析するためには、目的組織での化学物質濃度を知る必要があるため、化学物質の皮膚中濃度を測定することが外用医薬品や化粧品の有効性や安全性を評価するために重要となる。また、化学物質の皮膚中濃度測定は、外用医薬品や化粧品の製剤設計を効率的に進めるためにも重要である。一方で、化学物質の皮膚中濃度の実測値の決定方法には、様々な問題点が残っている。例えば、皮膚中濃度の決定には、ヒトまたは動物皮膚サンプルが数多く必要なこと、製剤の皮膚からの除去方法が難しいこと、皮膚からの化学物質の抽出率を考慮する必要があること、皮膚中濃度が一定になるまでの時間が長く、測定時間がかかること等が挙げられる。したがって、迅速で正確な皮膚中濃度測定法が必要となる。

本章では、薬物や化粧品有効成分の皮膚透過評価において代替膜として使用されている均一な 1 層膜であるシリコン膜<sup>27-29)</sup>および摘出皮膚を用いて化学物質の膜・皮膚透過試験から得られる透過パラメータを用いた膜・皮膚中平均濃度予測法に

について検討した。

## 第1節 1層および2層膜モデルを用いた皮膚透過性および皮膚中平均濃度予測における理論<sup>30-33)</sup>

### 1.1. 1層膜モデル皮膚中平均濃度予測<sup>34,35)</sup>

Figure 1a に 1 層膜を介した化学物質の膜透過速度が定常状態時の concentration-distance profile を示す。均一な 1 層膜中での化学物質の膜中拡散は、式(1)に示す Fick の拡散第 2 法則で表すことができる。

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (1)$$

ここで、 $C$  は膜の位置  $x$ 、時間  $t$  における化学物質の膜中濃度である。式(1)に以下の初期条件 ( $I.C.$ ) と境界条件 ( $B.C.$ ) を用いると、

$$I.C. \quad t=0 \quad 0 < x < L \quad C=0$$

$$B.C. \quad t>0 \quad x=0 \quad C=KC_v$$

$$x=L \quad C=0$$

$C$  は以下に示す式(2)で表すことができる。

$$C = KC_v \left[ \left(1 - \frac{x}{L}\right) - \frac{2}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n} \sin\left(\frac{n\pi x}{L}\right) \exp\left(-\frac{Dn^2\pi^2}{L^2}t\right) \right] \quad (2)$$

ここで、 $L$  は膜の厚さ、 $K$  は膜/基剤間の分配係数、 $C_v$  は基剤中化学物質濃度を示す。なお、分配係数は基剤から皮膚への分配量の尺度となり、この値が大きくなるほど皮膚透過性も高くなる。

また、定常状態になるに十分な時間を迎えたときの膜中濃度  $C_{ss}$  は式(3)で表すことができる。

$$C_{ss} = KC_v \left(1 - \frac{x}{L_x}\right) \quad (3)$$

さらに、膜中平均濃度は式(2)を  $x$  に関して膜厚 0 から  $L$  まで積分して、式(4)で表すことができる。

$$\bar{C} = \frac{KC_v}{2} \left\{ 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{m=1}^{\infty} \frac{1}{(2m-1)^2} \exp\left(-\frac{D(2m-1)^2 \pi^2}{L^2} t\right) \right\} \quad (4)$$

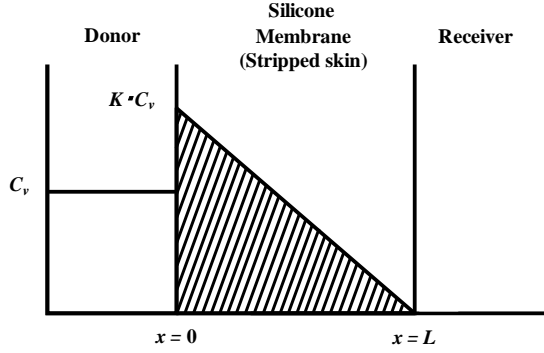
式(4)も同様に定常状態を迎えると、式(5)で表すことができる。

$$\bar{C}_{ss} = \frac{KC_v}{2} \quad (5)$$

式(5)から明らかなように、定常状態での膜中平均濃度を決定するパラメータは、化学物質の透過速度が一定(定常状態)になるまでの速さと関係する拡散係数  $D$  ではなく、適用濃度  $C_v$  と分配係数  $K$  であることが分かる。したがって、適用濃度は既知の値であるため、分配係数の値を得ることができれば定常状態膜中濃度を算出できる。

以上より、分配係数は、皮膚中濃度に大きく関わるパラメータであるが、その値は基剤を変えることで大きくも小さくもなる。したがって、基剤の違いは局所作用を目的とした外用医薬品や化粧品評価の際に最も考慮しなくてはならないパラメータである。

a) One-layered diffusion model



b) Two-layered diffusion model

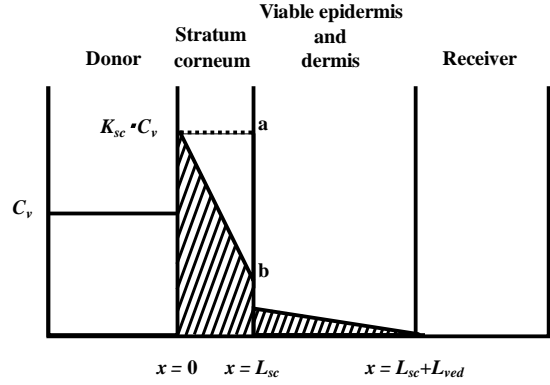


Fig. 1 Schematic diagram of concentration-distance profiles in one- and two-layered diffusion membrane models in membrane permeation experiments.

1.2. 2 層膜モデル皮膚中平均濃度予測

2 層膜モデルにおいて、皮膚全体の透過係数  $P_{tot}$  は角層の透過係数  $P_{sc}$  と viable epidermis and dermis の透過係数  $P_{ved}$  を用いて以下のように示される<sup>36)</sup>。

$$\frac{1}{P_{tot}} = \frac{1}{P_{sc}} + \frac{1}{P_{ved}} \quad (6)$$

これら透過係数の逆数  $1/P_{tot}$ 、 $1/P_{sc}$ 、 $1/P_{ved}$  は透過抵抗  $R_{tot}$ 、 $R_{sc}$ 、 $R_{ved}$  となるので

$$R_{tot} = R_{sc} + R_{ved} \quad (7)$$

と表すことができる。

Figure 1b の角層と生きた表皮・真皮界面での point a および b において、a と b の差と b の比が  $R_{sc}$  と  $R_{ved}$  の比で示されることになる。すなわち point b での化学物質濃度は式(8)で表すことができる。

$$C_b = K_{sc} \times C_v \times R_{ved} / R_{tot} \quad (8)$$

式(8)を用いることにより、単位面積あたりの角層中化学物質質量  $M_{sc}$  は式(9)で表す

ことができる。

$$M_{sc} = (K_{sc} \times C_v + K_{sc} \times C_v \times R_{ved}/R_{tot}) \times L_{sc} / 2 \quad (9)$$

また、角層から生きた表皮・真皮への分配係数は  $K_{sc}$  と  $K_{ved}$  の定義から  $K_{ved}/K_{sc}$  と表すことができる。この比を使って単位面積当たりの生きた表皮・真皮中化学物質質量  $M_{ved}$  は式(10)で表すことができる。

$$M_{ved} = K_{ved} \times C_v \times L_{ved} \times R_{ved} / R_{tot} / 2 \quad (10)$$

式(9)と式(10)の和が単位面積あたりの皮膚中化学物質質量  $M_{tot}$  となり、次のように示すことができる。

$$M_{tot} = \frac{C_v}{2} \{ K_{sc} \times L_{sc} \times (1 + R_{ved} / R_{tot}) + K_{ved} \times L_{ved} \times R_{ved} / R_{tot} \} \quad (11)$$

式(11)を  $L_{tot}$  で除することによって、化学物質の皮膚中平均濃度  $C_{ss}$  が求められる。

$$C_{ss} = \frac{C_v}{2 \times L_{tot}} \{ K_{sc} \times L_{sc} \times (1 + R_{ved} / R_{tot}) + K_{ved} \times L_{ved} \times R_{ved} / R_{tot} \} \quad (12)$$

式(13)を透過係数  $P$  で示すと次のように変形できる。

$$C_{ss} = \frac{C_v}{2 \times L_{tot}} \{ K_{sc} \times L_{sc} \times (1 + P_{tot} / P_{ved}) + K_{ved} \times L_{ved} \times P_{tot} / P_{ved} \} \quad (13)$$

### 1.3. 1 層膜透過パラメータの解析方法<sup>33)</sup>

シリコーン膜は均一な 1 層膜であるが角層を粘着テープで完全に剥ぎ取った stripped skin も均一な 1 層膜と考えられるため、試験化学物質として選択したパラベン類のシリコーン膜および stripped skin 透過挙動は前述の 1 層膜モデルに従うとして解析した。その際、用いた膜透過実験においてレシーバー側のシンク条件 ( $C = 0$ ) が成り立つとすると、時間  $t$  における単位面積あたりの膜を介した化学物質透過量  $Q$  は以下の式で示される。

$$Q = KLC_v \left[ \frac{D}{L_2} t - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \exp\left(-\frac{D}{L^2} n^2 \pi^2 t\right) \right] \quad (14)$$

各パラベン類の分配パラメータ ( $K \cdot L$ ) と拡散パラメータ ( $D/L^2$ ) は累積膜透過データを式(14)に非線形最小二乗法を用いてカーブフィティングすることにより算出した。なお、最小二乗法は Microsoft® Excel Solver の Pseudo-Newtonian 法を使って行った。また、シリコーン膜の分配係数は、カーブフィティングすることにより算出した  $K \cdot L$  にシリコーン膜の厚み (0.0075 cm) で除することにより求め、stripped skin の分配係数はカーブフィティングすることにより算出した  $K \cdot L$  に生きた表皮・真皮の厚み (0.0585 cm) で除することにより求めた。さらに、シリコーン膜の拡散係数は、カーブフィティングすることにより算出した  $D/L^2$  とシリコーン膜の厚みの 2 乗の積で求め、stripped skin の拡散係数はカーブフィティングすることにより算出した  $D/L^2$  に生きた表皮・真皮の厚みの 2 乗の積で求めた。加えて、得られた拡散係数と分配係数を、式(15)に代入して透過係数も同時に算出した。

$$P = \frac{KD}{L} \quad (15)$$

#### 1.4. 2 層膜透過パラメータの解析方法<sup>32,33)</sup>

ヘアレスラット full-thickness skin を角層と生きた表皮・真皮からなる 2 層膜と仮定して、Fick の拡散則を用いて化学物質の皮膚透過挙動を解析した。化学物質の角層中濃度  $C_{sc}$  と生きた表皮・真皮中濃度  $C_{ved}$  は以下の式で表すことができる。

$$\frac{\partial C_{sc}}{\partial t} = D_{sc} \frac{\partial^2 C_{sc}}{\partial x^2} \quad (16)$$

$$\frac{\partial C_{ved}}{\partial t} = D_{ved} \frac{\partial^2 C_{ved}}{\partial x^2} \quad (17)$$

ここで、 $D_{sc}$  は角層中拡散係数、 $D_{ved}$  は生きた表皮・真皮中拡散係数を示す。

初期条件 (I.C.) および境界条件 (B.C.) は以下のように仮定した。

$$\begin{aligned}
I.C. \quad t=0 \quad & 0 < x < L_{sc} \quad C_{sc} = 0 \\
& L_{sc} < x < L_{ved} \quad C_{ved} = 0 \\
B.C. \quad t > 0 \quad & x = 0 \quad C_{sc} = K_{sc} C_v \\
& x = L_{sc} \quad C_{ved} = K_{ved/sc} C_{sc} \quad \text{および} \quad D_{sc} \frac{dC_{sc}}{dx} = D_{ved} \frac{dC_{ved}}{dx} \\
& x = L_{ved} \quad C_{ved} = 0
\end{aligned}$$

$C_{sc}$  および  $C_{ved}$  は、 $I.C.$  および  $B.C.$  から Fick の拡散第 2 法則に従って変化すると仮定すると、差分法を用いて計算できる。化学物質の full-thickness skin 透過速度  $Flux$  は式(18)で、また、単位面積当たりの full-thickness skin 累積透過量  $Q$  は式(19)で表すことができる。

$$Flux = -D_{ved} \left( \frac{dC_{ved}}{dx} \right)_{x=L_{ved}} \quad (18)$$

$$Q = -D_{ved} \int_0^t \left( \frac{dC_{ved}}{dx} \right)_{x=L_{ved}} dt \quad (19)$$

また、式(16)は式(20)および式(21)に、式(17)は式(22)および式(23)に変換することができる。

$$\frac{dC_{sc\,i,j}}{dt} = \frac{1}{\Delta t} (C_{sc\,i,j+1} - C_{sc\,i,j}) \quad (20)$$

$$\frac{d^2 C_{sc\,i,j}}{dx^2} = \frac{1}{\Delta x^2} (C_{sc\,i-1,j} - 2C_{sc\,i,j} + C_{sc\,i+1,j}) \quad (21)$$

$$\frac{dC_{ved\,i,j}}{dt} = \frac{1}{\Delta t} (C_{ved\,i,j+1} - C_{ved\,i,j}) \quad (22)$$

$$\frac{d^2 C_{ved\,i,j}}{dx^2} = \frac{1}{\Delta x^2} (C_{ved\,i-1,j} - 2C_{ved\,i,j} + C_{ved\,i+1,j}) \quad (23)$$

ここで、 $C_{i,j}$  は皮膚における  $i$  番目の位置の  $j$  番目の時間の濃度を表す。なお、 $\Delta x$  は  $x_{i+1} - x_i$  を表し、 $\Delta t$  は  $t_{j+1} - t_j$  を表す。式(20)および式(21)を式(16)に、式(22)および



式(23)は式(17)に代入すると次式が得られる。

$$C_{sc\ i,j+1} = rD_{sc}C_{sc\ i-1,j} + (1 - 2rD_{sc})C_{sc\ i,j} + rD_{sc}C_{sc\ i+1,j} \quad (24)$$

$$C_{ved\ i,j+1} = rD_{ved}C_{ved\ i-1,j} + (1 - 2rD_{ved})C_{ved\ i,j} + rD_{ved}C_{ved\ i+1,j} \quad (25)$$

ここで、 $r$  は  $\Delta t/\Delta x^2$ を示す。

差分法を用いると、式(18)は式(26)に、式(19)は式(27)で表すことができる。

$$Flux_j = -D_{ved} \frac{C_{ved\ n+1,j} - C_{ved\ n,j}}{\Delta x} \quad (26)$$

$$Q_j = Q_{j-1} + Flux_j \Delta t \quad (27)$$

ここで、 $n$  は皮膚の区分数を示す。

$Flux_j$ を以上の方法に従って表計算ソフト Microsoft<sup>®</sup> Excelを用いて計算した。なお、今回は  $n = 10$  とした。透過係数  $P_{tot}$ と  $P_{ved}$ 、 $K_{sc}$ と  $K_{ved}$ は累積透過量  $Q_j$  の実測値を非線形最小二乗法を用いてカーブフィッティングすることにより算出した。その際、はじめに stripped skin 透過挙動から  $P_{ved}$ および  $K_{ved}$ を求め、 $P_{ved}$ 、 $K_{ved}$ および full-thickness skin 透過挙動から  $P_{tot}$ および  $K_{sc}$ を求めた。なお、最小二乗法計算は Microsoft<sup>®</sup> Excel Solver の Pseudo-Newtonian 法を使って行った。

## 第2節 実験方法

### 2.1. 試薬

試験化学物質として用いた各パラベン類(*p*-ヒドロキシ安息香酸メチル(MP)、*p*-ヒドロキシ安息香酸エチル(EP)、*p*-ヒドロキシ安息香酸プロピル(PP)、*p*-ヒドロキシ安息香酸ブチル(BP))は東京化成株式会社(東京、日本)より購入した。Table 1 にパラベン類の物理化学的性質を示す。なお、これらの溶解度パラメータは次に示す Fedor 法<sup>37)</sup>により計算した。

$$\delta = \sqrt{\frac{\sum E_{coh}}{\sum V}} \quad (28)$$

ここで、 $\delta$ は溶解度パラメータ( $(\text{J}/\text{cm}^3)^{1/2}$ )、 $E_{coh}$ は各部分の凝集エネルギー( $\text{J}/\text{mol}$ )への寄与、 $\sum V$ は計算上のモル容積( $\text{cm}^3/\text{mol}$ )を示す。

エステラーゼ阻害剤であるフルオロリン酸ジイソプロピル(DFP)および除タンパク剤であるトリクロロ酢酸(TCA)は和光純薬株式会社(大阪、日本)から購入した。その他の試薬および溶媒は、市販の液体クロマトグラフ用または特級品を、精製せずにそのまま用いた。

シリコーン膜(Dow Corning® 7-41-7 Silicone Elastomer Membrane)は長瀬産業株式会社(東京、日本)より供与された。この膜の厚みは 0.0075 cm である。

Table 1 Physicochemical properties of parabens

	MP	EP	PP	BP
<i>M.W.</i>	152.2	166.1	180.2	194.2
$\log K_{o/w}$ <sup>a)</sup>	1.93	2.27	2.81	3.53
Solubility parameter value ((J/cm <sup>3</sup> ) <sup>1/2</sup> )	27.2	26.2	25.4	24.7

a) *n*-Octanol/water partition coefficient of parabens at 37°C.

## 2.2. 実験動物

雄性ヘアレスラット(WBM/ILA-Ht, 体重 230-280 g)は、城西大学生命科学研究センター(埼玉、日本)または石川実験動物研究所(埼玉、日本)から購入した。ヘアレスラットは、 $25 \pm 2^\circ\text{C}$  に調節され 12 時間ごとに明暗サイクル(on、off 時間:7:00-19:00)を設定した部屋で飼育した。水と餌は自由に摂取可能とした。なお、動物実験は、城西大学動物実験管理委員会の承諾(No.: H1813)を得た後、城西大学実験動物規定に従って行った。

## 2.3. 膜透過実験

シリコーン膜:シリコーン膜を切り取り、縦型拡散セル(セル容量 6.0 mL、有効透過面積  $1.77\text{ cm}^2$ )のレシーバー側セルに Silicone sealant(東洋紡、大阪、日本)で固定し、セットした。レシーバー側セルに pH7.4 の等張リン酸塩緩衝液(PBS)を 15 分適用し、その後ドナー側セルにパラベン類を溶解させた(MP: 10 mM、EP: 5 mM、PP: 1 mM、

BP: 0.5 mM) pH7.4 PBS 0.5 mL を適用し、透過実験を行った。実験中、セル内に 32°C の水を循環させ、レシーバー側溶液はマグネットスターラーで攪拌した。経時的にレシーバー側から溶液を採取し、同量の PBS を戻した。得られたサンプル溶液のパラベン類濃度は HPLC を用いて測定した(2.6.)。

ヘアレスラット皮膚 : Full-thickness skin は、ペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg, *i.p.*) で、水を湿らせたキムワイプでヘアレスラットの腹部皮膚を清拭してから摘出した。なお、stripped skin 透過試験に用いた皮膚は、清拭した腹部皮膚を粘着テープ (セロテープ<sup>®</sup>、ニチバン株式会社、東京、日本) を用いて、20 回 tape-stripping 処理<sup>38-40)</sup> を施し、皮膚を摘出した。Full-thickness、stripped skin 共に、摘出皮膚の真皮側の脂肪を取り除き、直ちに 32°C の水を循環させた縦型拡散セルに挟んだ。真皮側に DFP (2.7  $\mu\text{mol/mL}$ ) を溶解した PBS を 30 分適用し、その後に DFP を取り除いてパラベン類の皮膚透過実験を行った<sup>32,41,42)</sup>。すなわち、角層側にはシリコーン膜透過実験と同様に、パラベン類を溶解させた PBS 0.5 mL を、真皮側に DFP (0.54  $\mu\text{mol/mL}$ ) を溶解した PBS を適用し、パラベン類の透過実験を行った。実験中、真皮側溶液はマグネットスターラーで攪拌した。経時的に真皮側から溶液を 400  $\mu\text{L}$  採取し、同量の PBS を戻した。得られたサンプル溶液のパラベン類濃度は HPLC を用いて測定した(2.6.)。

なお、stripped skin の透過実験解析については、ドナー中化学物質濃度の減少が考えられたため、透過実験終了後のドナー側濃度で全量を補正した。

#### 2.4. シリコーン膜およびヘアレスラット皮膚からの化学物質の抽出率測定方法

シリコーン膜 : クロロホルムに溶解した既知濃度のパラベン類溶液をシリコーン膜に適用してから 1 時間インキュベートし、クロロホルムを完全に蒸発させた。次に、1.0 mL のクロロホルムを加え、15 分間攪拌し、パラベン類を抽出した。得られたクロロホルム

抽出液を別の容器に移し、再びシリコーン膜にクロロホルム 1.0 mL を加え同様に抽出を行った。2 回目の抽出液を 1 回目の抽出液と混和し、さらに、その抽出液を蒸発・乾固させた後、アセトニトリルで再溶解させ、HPLC を用いて種々パラベン量を測定した(2.6.)。抽出量を適用量で除すことによりパラベン類のシリコーン膜からの抽出率を算出した。MP の抽出率は  $69.1\% \pm 0.5$ 、EP の抽出率は  $75.4\% \pm 0.2$ 、PP の抽出率は  $77.5\% \pm 0.3$ 、BP の抽出率は  $76.9\% \pm 1.1$  であった。

ヘアレスラット皮膚 : DFP 処理後の皮膚を有効透過面積( $1.77 \text{ cm}^2$ )に切り取った。切り取った皮膚をハサミで細断し、PBS に溶解した既知濃度のパラベン類溶液を 1.0 mL 加え、電動ホモジナイザー(12000 rpm, 5 min,  $4^\circ\text{C}$ ) (Polytron PT-MR 3000, Kinematica, Switzerland)を用いてホモジナイズした。その後、 $32^\circ\text{C}$  の条件下で、1 時間インキュベートした。次に、PBS に溶解させた 16%トリクロロ酢酸溶液を 1.0 mL 加え 15 分間攪拌し、遠心分離(15000 rpm, 5 min,  $4^\circ\text{C}$ )後、上清を HPLC を用いて測定した(2.6.)。その後、PBS 抽出液を別の容器に移し、ホモジナイズした皮膚にクロロホルム 1.0 mL を加え、15 分間攪拌して再び抽出した。そして、遠心分離(15000 rpm, 5 min,  $4^\circ\text{C}$ )し、抽出液を別の容器に移した。抽出液を蒸発・乾固させ、アセトニトリルで再溶解させたものを HPLC を用いて測定した(2.6.)。なお、PBS で抽出したパラベン量とクロロホルムで抽出したパラベン量を足したものを抽出量とし、抽出量を適用量で除した値をパラベン類のヘアレスラット皮膚からの抽出率とした。MP の抽出率は  $62.5\% \pm 4.3$ 、EP の抽出率は  $42.0\% \pm 2.7$ 、PP の抽出率は  $48.8\% \pm 0.6$ 、BP の抽出率は  $46.1\% \pm 4.1$  であった。

## 2.5. シリコーン膜およびヘアレスラット皮膚中濃度の測定方法

透過実験終了後、ドナー溶液を回収し、パラベン類適用側のシリコーン膜表面を

PBS 1.0 mL で 2 回洗浄した。なお、シリコーン膜透過実験は、パラベン類のシリコーン膜透過速度が定常状態時に終了した。その後、シリコーン膜を拡散セルから取り外し、有効透過面積 ( $1.77 \text{ cm}^2$ ) 部分を切り取り、クロロホルムを加え、シリコーン膜からパラベン類を抽出した。なお、シリコーン膜からの抽出方法は(2.4.)に記した測定方法と同様に行った。膜中濃度は HPLC で定量した(2.6.)パラベン類量を有効透過面積 ( $1.77 \text{ cm}^2$ ) と膜の厚さ ( $0.0075 \text{ cm}$ ) で除したものに、抽出率を考慮して計算し、これを実測膜中濃度とした。

一方、皮膚中濃度は、皮膚透過実験終了後、ドナー溶液を回収し、パラベン類適用側皮膚表面を PBS 1.0 mL で 2 回洗浄した。その後、皮膚を拡散セルから取り外し有効透過面積 ( $1.77 \text{ cm}^2$ ) で切り取り、冷凍保存した。冷凍保存した皮膚をハサミで切断し、PBS を 1.0 mL 加え、電動ホモジナイザー (12000 rpm, 5 min,  $4^\circ\text{C}$ ) を用いてホモジナイズした。次に、PBS に溶解させた 16% トリクロロ酢酸溶液を 1.0 mL 加え 15 分間攪拌し、遠心分離 (15000 rpm, 5 min,  $4^\circ\text{C}$ ) 後、上清を HPLC を用いて測定した。なお、皮膚からの抽出方法は(2.4.)に記した測定方法と同様に行った。皮膚中濃度は PBS で抽出したパラベン類の皮膚中量とクロロホルムで抽出したパラベン類の皮膚中量を足した値を皮膚中パラベン類量とし、皮膚中パラベン類量を皮膚重量で除し、抽出率を考慮したものを実測皮膚中濃度とした。

## 2.6. 分析方法

EP、MP、BP、PP をそれぞれ MP、EP、PP、BP の内部標準物質とし、採取した試料溶液を内部標準物質を溶解したアセトニトリルと 1 : 1 の容積比で混和した。その後、遠心分離 (15000 rpm, 5 min,  $4^\circ\text{C}$ ) によりタンパク除去後、得られた上清中のパラベン類濃度を HPLC を用いて測定した。HPLC のシステムは、system controller (SCL-6B; 島津製作所、京都、日本)、pump (LC-10AD; 島津製作所)、auto-injector (SIL-7A; 島

津製作所)、column oven(CTO-6A; 島津製作所)、UV detector(SPD-6A; 島津製作所)、chromatopac(C-R6A; 島津製作所)を用いた。定量条件として、カラムはLiChroCART®250-4(KGaA; 64271; Merck, Darmstadt, Germany)を、カラム温度は40°Cとした。移動相はMPおよびEPの場合、0.1% phosphoric acid : acetonitrile = 75 : 25、PPおよびBPの場合、0.1% phosphoric acid : acetonitrile = 55 : 45を用い、流速1.0 mL/minとした。また、injection volumeは20 µLとし、検出波長UV 260 nmでピーク面積比を測定した。

## 2.7. 統計解析

シリコーン膜透過性から計算した膜中濃度の計算値とシリコーン膜の実測値の相関性の検定、皮膚透過性から計算した皮膚中濃度の計算値と皮膚中濃度の実測値の相関性の検定、シリコーン膜透過性から計算した基剤からシリコーン膜への分配係数と皮膚透過性から計算した基剤から皮膚への分配係数の相関性の検定およびシリコーン膜透過性から計算した膜中濃度の計算値と皮膚中濃度の実測値の相関性の検定には、Pearsonの相関係数を用い、いずれの場合も危険率5% 以下を有意と判断した。

### 第3節 結果・考察

#### 3.1. シリコーン膜中濃度

化学物質の相 A から相 B への分配は物理学的な現象であり、これは溶液から膜への分配であっても同様と考えられる。したがって、溶液からヒト皮膚や動物皮膚への分配も、皮膚と同等の物理化学的性質を有する膜があれば、これらの皮膚を用いなくても評価できると考えられる。本研究では、シリコーン膜を選択した。シリコーン膜は、ヒト皮膚や動物皮膚の代わりとして安定で入手しやすく、これまでに多くの研究室でシリコーン膜を用いた皮膚透過性予測が行われている<sup>27-29)</sup>。まず、基剤から膜へ移行した化学物質の膜中濃度を化学物質の膜透過プロファイルより得られた分配係数を用いて算出し、この計算値(理論値)と実測した膜中濃度との比較を行った。さらにその結果より、膜中濃度が理論に基づき、分配係数を用いて予測可能であるか確認した。

Figure 2 にパラベン類の累積シリコーン膜透過量を示す。Figure 2a には raw data を Fig. 2b には、それぞれの適用濃度で除すことにより膜透過量を補正した<sup>43,44)</sup> normalized data を示す。Figure 2a よりシリコーン膜を介したパラベン類の皮膚中拡散は速く、わずか 4 分で十分に膜透過が定常状態になることを確認することができた。Figure 2b のグラフより、シリコーン膜透過量は BP が最も高く、続いて PP、EP、そして MP となり、親油性が高くなるにしたがって適用濃度に対する透過量が高くなることを確認した。

通常の化学物質は、 $n$ -オクタノール-水分配係数( $K_{ow}$ )が大きくなるにつれて溶解度パラメータは小さくなる<sup>45,46)</sup>。今回用いたパラベン類の中では MP の溶解度パラメータが最も大きく、続いて EP、PP、BP の順であった。また、式(29)に示したように、2 成



分系の溶解度パラメータの差の 2 乗が小さいものほど、透過係数が高くなる<sup>47)</sup>。

$$\ln P = [(\delta_V - \delta_D)^2 - (\delta_M - \delta_D)^2] \frac{V}{RT} + \ln \frac{D}{L} \quad (29)$$

ここで、 $\delta_V$ は基剤の溶解度パラメータ ( $\text{J}/\text{cm}^3)^{1/2}$ )、 $\delta_D$ は透過する化学物質の溶解度パラメータ ( $\text{J}/\text{cm}^3)^{1/2}$ )、 $\delta_M$ は膜の溶解度パラメータ ( $\text{J}/\text{cm}^3)^{1/2}$ )、 $V$  は透過する化学物質のモル容積 ( $\text{cm}^3/\text{mol}$ )、 $R$  は気体定数 ( $\text{J}/\text{kmol}$ )、そして  $T$  は絶対温度 ( $\text{K}$ ) を示す。

シリコン膜の溶解度パラメータは、 $16.4 (\text{J}/\text{cm}^3)^{1/2}$ <sup>46)</sup>であることから、シリコン膜透過性は、シリコン膜との溶解度パラメータの差の 2 乗が最も小さい BP が最も高かったと考えられた。

Figure 3 に、パラベン類の透過実験後のシリコン膜中濃度の実測値(a)と適用濃度で補正した膜中濃度の normalized data(b)を示す。Figure 3a より、バラツキが少なくシリコン膜中濃度を測定できることが考えられた。Figure 3b より、パラベン類の  $K_{o/w}$  が高くなるにつれて、適用濃度に対する膜中濃度の割合も増加することを確認した。

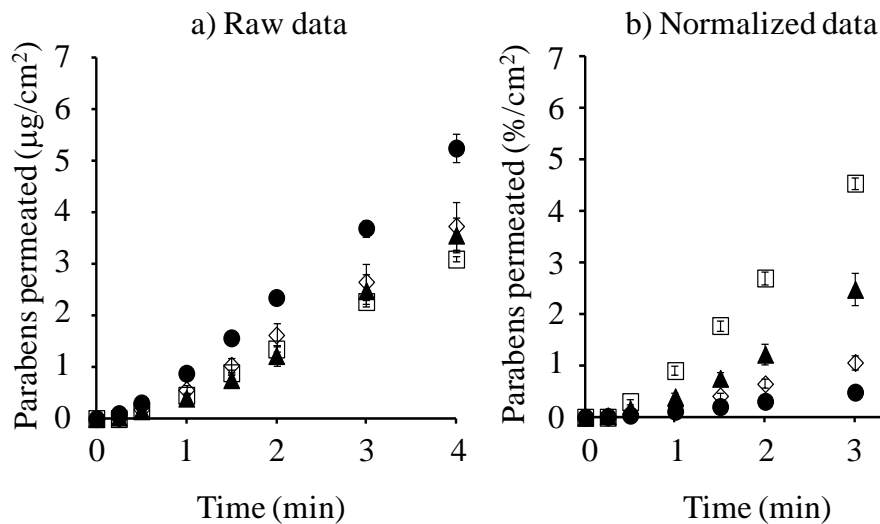


Fig. 2 Time course of the cumulative amount of parabens that permeated through the silicone membrane. (a) Raw data, (b) normalized data. Symbols: ●: MP, ◇: EP, ▲: PP, □: BP. Data are shown as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 4-8$ ).

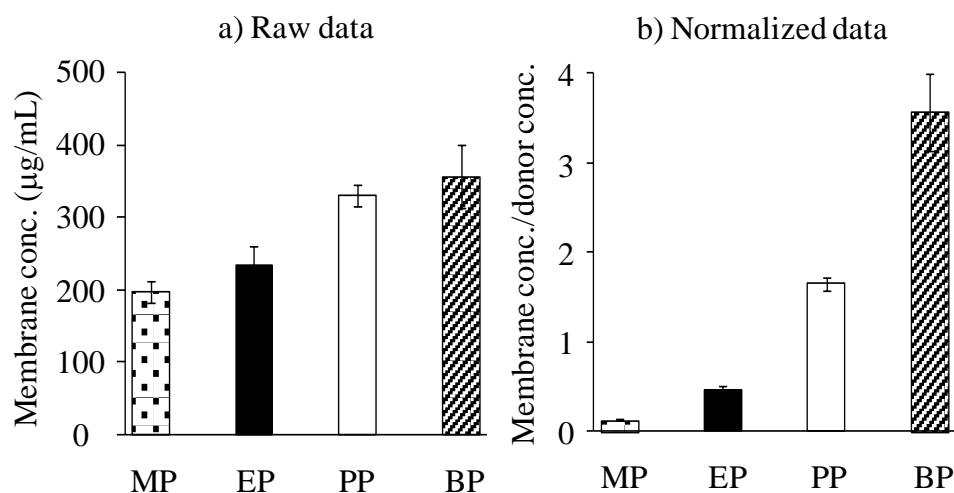


Fig. 3 Raw data (a) and normalized data [(silicone membrane concentration)/(donor concentration)] (b) for steady-state concentration of parabens in the silicone membrane. Data are shown as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 4-8$ ).

Figure 4 に、1 層の均一な膜であるシリコーン膜を介したパラベン類の膜透過パラメータを用いて、式(5)より算出したシリコーン膜中濃度と実測値の関係を示す。また、Table 2 にシリコーン膜透過挙動より算出したシリコーン膜透過パラメータを示す。このグラフから、シリコーン膜の計算値と実測値は 1:1 の相関性があることが分かった。これより、シリコーン膜の 1 層膜モデルでの透過性解析は十分信頼可能であること、および膜中濃度を決定するのは適用濃度と分配係数であるとする理論と一致することが明らかとなった。また、透過実験より得られたプロファイルを解析するだけで簡便に膜中濃度を予測できることが示唆された。

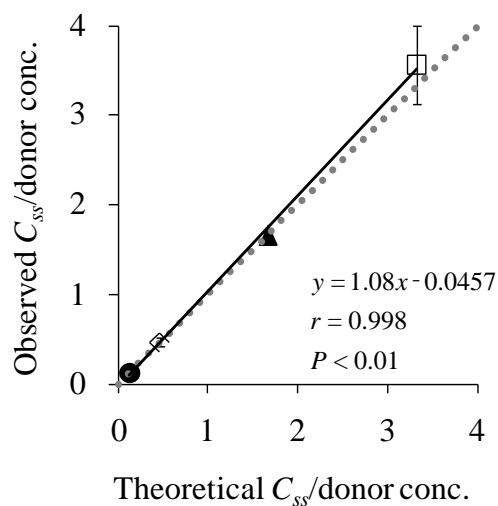


Fig. 4 Relationship between theoretical and observed steady-state silicone membrane concentration of parabens. One-layered diffusion membrane model was used to obtain theoretical steady-state concentration of parabens. Symbols: ●: MP, ◇: EP, ▲: PP, □: BP. Continuous line is the regression line for silicone membrane concentration of parabens. Dashed line is 1 : 1 correlation between the observed value and theoretical value. Data are shown as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 4-8$ ).

Table 2 Silicone membrane permeation parameters of parabens

	$P$ (cm/s)	$K$	$D$ (cm <sup>2</sup> /s)
MP	$1.5 \times 10^{-5}$	0.26	$4.1 \times 10^{-7}$
EP	$3.5 \times 10^{-5}$	0.91	$2.6 \times 10^{-7}$
PP	$8.8 \times 10^{-5}$	3.3	$1.8 \times 10^{-7}$
BP	$1.6 \times 10^{-4}$	6.6	$1.7 \times 10^{-7}$

### 3. 2. 膜透過と膜中濃度:シリコーン膜と動物皮膚の比較

パラベン類のシリコーン膜透過実験より得られた分配係数を用いて、パラベン類の膜中濃度を算出し、算出した膜中濃度と実測した膜中濃度の比較を行った結果、膜への分配係数と膜中濃度の関係が理論に基づくことが分かった。そこで、皮膚でもシリコーン膜同様に、パラベン類の皮膚分配性と皮膚中濃度の関係を調べ、透過実験から得られた分配係数を用いてパラベン類の皮膚中濃度予測を行った。

また、パラベン類のシリコーン膜と皮膚中濃度の比較を行い、シリコーン膜を皮膚代替膜とした皮膚中濃度評価法の可能性について調べた。なお、摘出皮膚は、ヘアレスラット腹部皮膚を用いた。

Figure 5 にパラベン類の *in vitro* 累積皮膚透過量を示す。Figure 5a には raw data を Fig. 5b にはそれぞれの適用濃度で除すことにより補正した normalized data を示す。Figure 5a より、皮膚透過速度の場合もバラツキ少なく測定できることが明らかとなった。Figure 5b より BP を除く各パラベン類の透過速度の順位は、それらのシリコーン膜と類似していた。なお、興味深いことに、Fig. 2b で示したシリコーン膜透過速度は BP が最も高かったのに対し、Fig. 5b で示したラット皮膚透過速度では BP が最も低かった。シリコーン膜の場合、シリコーン膜の溶解度パラメータとパラベン類の溶解度パラメータの差の 2 乗の値の順位は、シリコーン膜透過速度の順位と一致した。したがって、シリコーン膜のように単純な膜の場合、溶解度パラメータを用いて、膜透過速度の順位を予測できるが、ラット皮膚の場合、ラット皮膚の溶解度パラメータとパラベン類の溶解度パラメータの差の 2 乗の値の順位は、ラット皮膚透過速度の順位と一致せず、溶解度パラメータでは、皮膚透過速度の順位を求めることが難しいと考えられた。この原因として、皮膚は複雑な構造を有しているということが考えられた。

Figure 6 に *in vitro* 皮膚透過実験後のパラベン類の皮膚中濃度の実測値 (a) raw data と適用濃度で補正した皮膚中濃度 (b) normalized data を示す。Figure 6a より、シリコーン膜同様、バラツキが少なく皮膚中濃度を測定することができると考えられた。また、Fig. 6b より、シリコーン膜同様、パラベン類の  $K_{o/w}$  が高くなるにつれて適用濃度に対する皮膚中濃度の割合が増加した。すなわち、皮膚透過速度の順位と皮膚中濃度の順位はラット摘出皮膚では一致しなかった。また、シリコーン膜中濃度と比較すると MP 以外のパラベン類では、シリコーン膜の方が高い膜中濃度を示すことがわかった (Fig. 3b, 6b)。

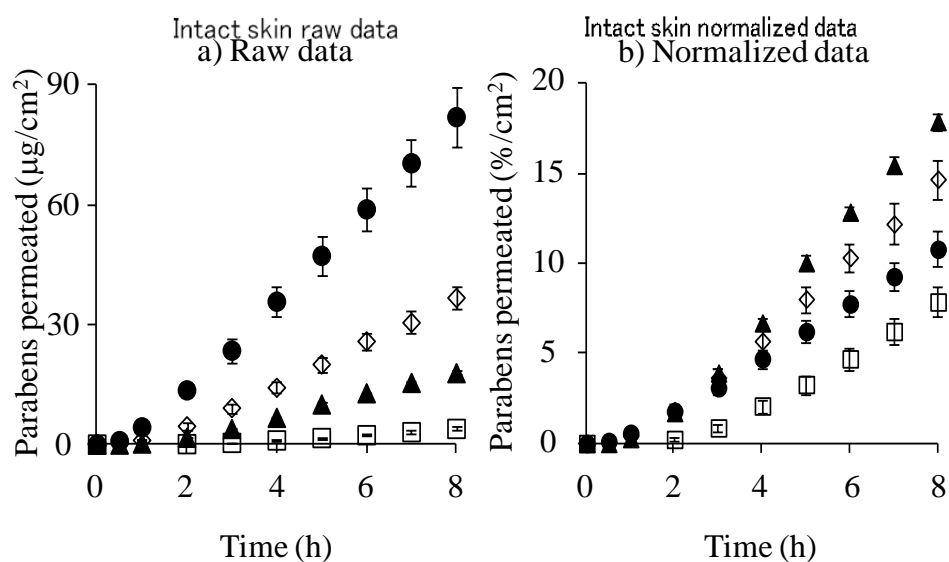


Fig. 5 Time course of the cumulative amount of parabens that permeated through the hairless rat full-thickness skin. (a) Raw data, (b) normalized data. Symbols: ●: MP, ◇: EP, ▲: PP, □: BP. Data are shown as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 5-11$ ).

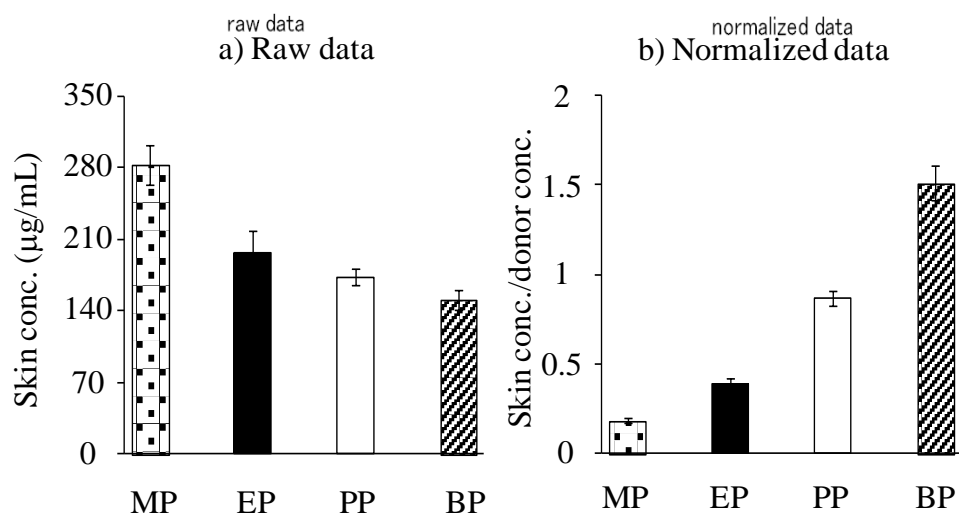


Fig. 6 Raw data (a) and normalized data [(skin concentration)/(donor concentration)] for steady-state concentration of parabens in the hairless rat skin. Data are shown as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 5-11$ ).

ラット摘出皮膚に関してもシリコーン膜と同様に、皮膚を均一な 1 層膜と仮定し、式 (14)を用いて算出した分配係数値より各パラベンの皮膚中濃度を予測した。

Figure 7 に皮膚を 1 層膜と仮定した時の皮膚透過パラメータを用いた皮膚中濃度の計算値と実測値の関係を示す。Table 3 に皮膚透過挙動を 1 層膜解析して算出した皮膚透過パラメータを示す。皮膚中濃度の計算値と実測値との間には 1:1 の相関を示さないことが分かった。しかし、高い相関関係 ( $r = 0.962$ ,  $P < 0.05$ ) があることから、得られた回帰式を用いることで、1 層膜モデルを用いて得られた分配係数より、皮膚中濃度を予測できると考えられた。なお、理論値と実測値が 1:1 の相関関係を示さないのは、ラット皮膚を均一な 1 層膜として仮定して解析したためであると考えられた。

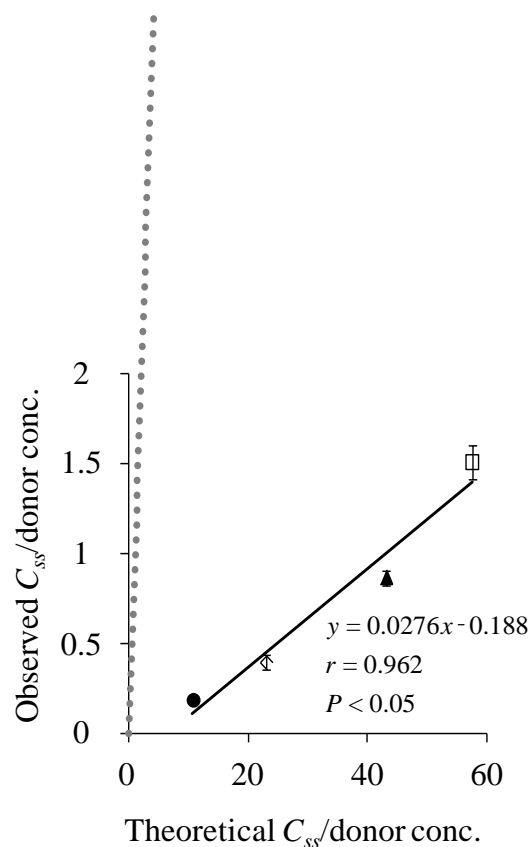


Fig. 7 Relationship between theoretical and observed steady-state hairless rat skin concentration of parabens. One-layered diffusion membrane model was used to obtain theoretical steady-state concentration of parabens. Symbols: ●: MP, ◇: EP, ▲: PP, □: BP. Continuous line is the regression line for skin concentration of parabens. Dashed line is 1 : 1 correlation between the observed value and theoretical value. Data are shown as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 5-11$ ).

Table 3 Skin permeation parameters of parabens supposing the one-layer membrane model

	$P$ (cm/s)	$K$	$D$ (cm <sup>2</sup> /s)
MP	$2.0 \times 10^{-6}$	21	$1.4 \times 10^{-10}$
EP	$3.2 \times 10^{-6}$	46	$1.0 \times 10^{-10}$
PP	$3.8 \times 10^{-6}$	83	$6.7 \times 10^{-11}$
BP	$1.3 \times 10^{-6}$	115	$1.6 \times 10^{-11}$

Figure 8 に、パラベン類のシリコン膜に対する分配係数とラット皮膚に対する分配係数の関係を示す。この 2 つの分配係数には、相関性が示唆されたが、有意な関係ではなかった ( $r = 0.942$ ,  $P > 0.05$ )。これは、本質的に不均一な膜である皮膚を均一な 1 層膜として解析したためと考えられた。

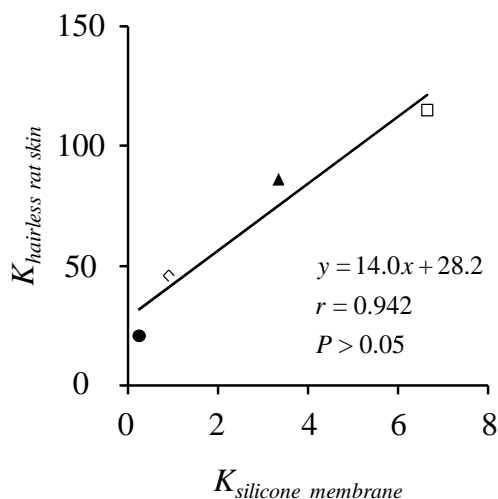


Fig. 8 Relationship between  $K$  to silicone membrane and  $K$  to rat skin (one-layered diffusion model). Symbols: ●: MP, ◇: EP, ▲: PP, □: BP. ( $n = 4-8$  in silicone membrane and 5-11 in hairless rat skin)

以上の結果より、パラベン類の皮膚中濃度の実測値と理論値には相関性があるものの、ラット皮膚は均一な 1 層膜とは考えられないため、シリコン膜のように簡単に膜中濃度の絶対値を予測できないことが示された。

### 3.3. 2 層膜モデルを用いた皮膚中化学物質濃度シミュレーション

3.2. ではパラベン類のラット皮膚透過データを 1 層膜モデルとして解析し、皮膚中



濃度を算出したが、実測値とは一致しなかった。これはラット皮膚を均一な 1 層膜として考えたことが原因と思われた。そこで、皮膚を「角層」と「生きた表皮・真皮」からなる 2 層膜モデルに従うと仮定して<sup>32)</sup>、パラベン類の皮膚透過データを Fick の拡散則に基づく差分式を用いた非線形最小二乗法で解析し、基剤(水溶液)から角層、さらには角層から生きた表皮・真皮への分配係数を算出し、これら分配係数と角層・生きた表皮・真皮の厚みから皮膚中濃度を算出した。そして、算出したパラベン類の皮膚中濃度の計算値(理論値)と実測値の比較を行った。

2 層膜モデルとして解析するために、まず、パラベン類の *in vitro* stripped skin 透過実験を行った。その結果を Fig. 9 に示す。Figure 9a には raw data を、Fig. 9b にはそれぞれの適用濃度で除すことにより補正した normalized data を示す。角層を剥離することにより、特に親水性化学物質の皮膚透過性が大きく増えることが明らかになった。

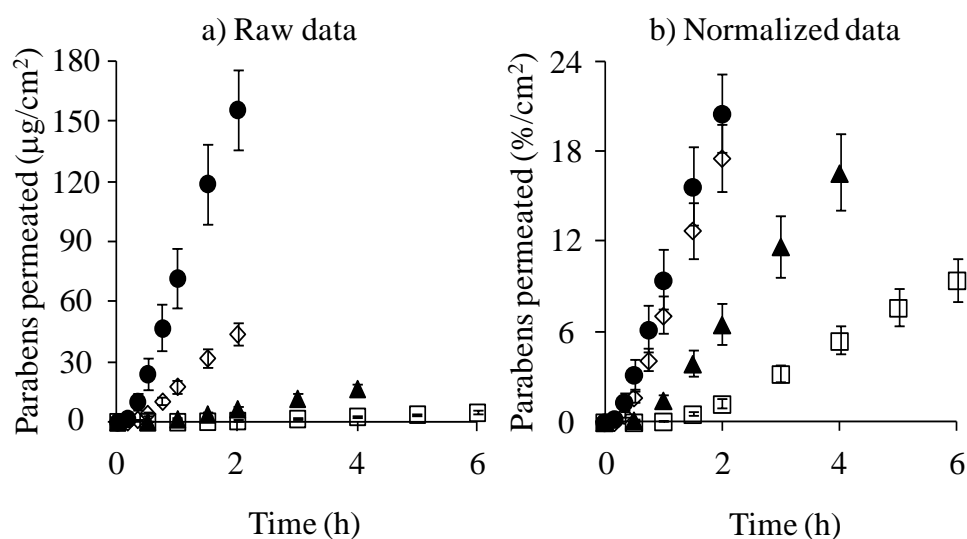


Fig. 9 Time course of the cumulative amount of parabens that permeated through the hairless rat stripped skin. (a) Raw data, (b) normalized data. Symbols: ●: MP, ◇: EP, ▲: PP, □: BP. Data are shown as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ).

Figure 10 に皮膚を 2 層と仮定し、得られた皮膚透過パラメータより算出したパラベン類の皮膚中濃度と実測値の関係を示す。Table 4 に皮膚透過挙動を 2 層膜解析して算出した皮膚透過パラメータを示す。皮膚中濃度の計算値と実測値との間には、ほぼ 1:1 に近い相関 ( $r = 0.980$ ,  $P < 0.05$ ) が得られた。この結果より *in vitro* 皮膚透過実験から得られた累積透過データを 2 層膜として解析することにより、皮膚中濃度予測がある程度可能であると示唆された。本研究では、化学物質の構造が似ているパラベン類のみで検討を行ったため、今後、幅広い物理化学的性質を有する化学物質 (分子量、極性の有無) を用いて検討を行い、皮膚中濃度を予測できる範囲の検討が必要であると考えられた。

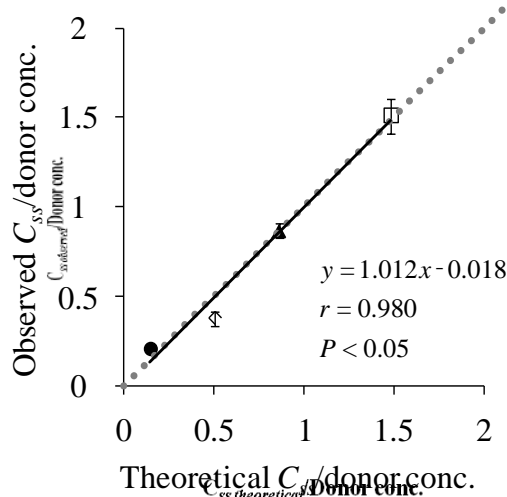


Fig. 10 Relationship between theoretical and observed  $C_{ss}$  in hairless rat skin. Two-layered diffusion membrane model was used to obtain theoretical steady-state skin concentration of parabens. Symbols: ●: MP, ◇: EP, ▲: PP, □: BP. Continuous line is the regression line for skin concentration of parabens. Dashed line is 1 : 1 correlation between the observed value and theoretical value. Data are shown as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 5-11$ ).

Table 4 Skin permeation parameters of parabens supposing the two-layer membrane model

	$P_{tot}$ (cm/s)	$P_{ved}$ (cm/s)	$K_{sc}$	$K_{ved}$	$D_{sc}$ (cm <sup>2</sup> /s)	$D_{ved}$ (cm <sup>2</sup> /s)
MP	$2.5 \times 10^{-6}$	$1.9 \times 10^{-5}$	4.6	3.0	$9.4 \times 10^{-10}$	$3.7 \times 10^{-7}$
EP	$5.7 \times 10^{-6}$	$2.0 \times 10^{-5}$	9.2	5.2	$9.4 \times 10^{-10}$	$2.2 \times 10^{-7}$
PP	$8.6 \times 10^{-7}$	$6.3 \times 10^{-6}$	48.6	2.6	$5.7 \times 10^{-10}$	$1.8 \times 10^{-7}$
BP	$1.3 \times 10^{-6}$	$3.5 \times 10^{-6}$	42.3	4.6	$9.7 \times 10^{-10}$	$3.3 \times 10^{-8}$

Figure 11 は、シリコーン膜透過試験より算出したパラベン類のシリコーン膜中濃度の計算値とラット皮膚中濃度の実測値を適用濃度で補正したものの関係を示す。シリコーン膜と皮膚中濃度の間に 1 : 1 の相関は得られなかったが、相関係数が 0.997 と有意な高い相関が得られたことから、シリコーン膜透過試験から、ラット皮膚中濃度を予測できることが示唆された。

以上の結果から、今後さらに基剤を変えた検討やパラベン類以外の化学物質、特に親水性化学物質を用いた同様な検討を行うことにより、シリコーン膜の代替膜としての有用性がさらに明らかになると思われる。

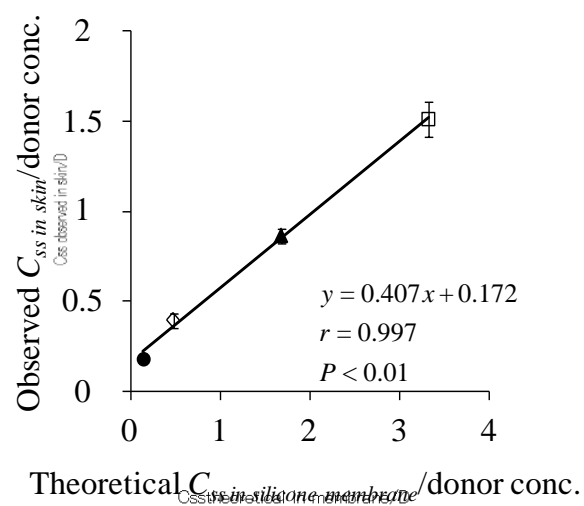


Fig. 11 Relationship between theoretical  $C_{ss}$  in silicone membrane/donor concentration and observed  $C_{ss}$  in rat skin/donor concentration. Symbols: ●: MP, ◊: EP, ▲: PP, □: BP. Data are shown as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3-8$ ).

#### 第4節 小括

本章における研究より、膜透過データを拡散則に従い解析することで、適用した化学物質のシリコーン膜やラット皮膚中濃度が容易に予測できることが示唆され、このことから膜透過データを拡散則に従い解析する方法が、外用医薬品や化粧品の製剤設計を効率的に進める手段として用いることができると考えられた。また、シリコーン膜を用いて、化学物質のラット皮膚中濃度予測が可能であることも示唆された。特に、シリコーン膜透過性からラット皮膚中濃度の予測が可能であることは、同様に化学物質のヒト皮膚中濃度の予測への適用の可能も示唆していると考えられる。いずれは、シリコーン膜がヒト皮膚代替膜としても使用されていくものと考えられる。しかし、今回は比較的親油性が高く、分子量がほとんど変わらないパラベン類をモデル化学物質として研究してきたため、今後は、パラベン類とは異なる性質を持つ化学物質での検討が必要である。また、皮膚中で作用する化学物質の安全性や有効性をさらに詳しく予測するには、皮膚各部位(作用部位)ごとに測定する必要があると考えられる。そのため、皮膚各部位(各深度)ごとに化学物質濃度の評価をすることができる2層人工膜モデルを構築するなどの努力が必要であると考えられる。さらに、本章の研究では *in vitro* で皮膚中濃度を予測しているため、*in vivo* での皮膚中濃度予測が可能であるか検討する必要があると考えられた。

## 第 2 章 皮膚透過パラメータを用いた皮膚各深度における濃度の予測

前章では、Fick の拡散則を用いて、化学物質の皮膚透過が定常状態時の皮膚中平均濃度式を算出し、計算値と実測値を比較した。その結果、化学物質の皮膚透過挙動より得られた透過パラメータから皮膚中平均濃度が容易に計算可能であることが明らかとなった<sup>48)</sup>。また、皮膚は 1 層膜でなく、死んだ細胞から成る角層と生きた表皮・真皮の 2 層と仮定して解析することが望ましいと考えられた。

局所作用を示す化学物質の有効性・安全性をより正確に予測するには、前章で算出した皮膚中平均濃度ではなく、各作用部位(各深度)での化学物質濃度が重要となる。本章では、皮膚中に効果もしくは毒性発現部位を有する化学物質の有効性と安全性を正確かつ簡便に予測する方法の確立を目的に、化学物質の皮膚透過パラメータから Fick の拡散則に基づいて定常状態における皮膚各深度における化学物質濃度の予測の可能性について検討した。

前章では、ヘアレスラット腹部皮膚を用いて検討を行った。しかし、ヘアレスラット腹部皮膚の角層は、ヒトやブタ皮膚と比べて、tape-stripping 法を用いて各深度における角層中濃度を測定することが難しい。そこで本章では、ブタ外耳皮膚の外側を用いて検討した。

## 第1節 2層膜モデルを用いた皮膚各深度における濃度予測の理論<sup>48)</sup>

前章 Fig. 1b より、角層深度  $x$  での定常状態化学物質濃度  $C_{sc,ss}$  は以下の式で表すことができる。

$$C_{sc,ss} = K_{sc} C_v - \frac{K_{sc} C_v}{L_{sc}} \left(1 - \frac{P_{tot}}{P_{ved}}\right) x \quad (30)$$

ただし、 $0 \leq x \leq L_{sc}$  である。

また、生きた表皮・真皮深度  $x$  での定常状態時の化学物質濃度  $C_{ved,ss}$  は以下の式で表すことができる。

$$C_{ved,ss} = K_{ved} C_v \frac{P_{tot}}{P_{ved}} \left(\frac{L_{sc} + L_{ved} - x}{L_{ved}}\right) \quad (31)$$

ただし、 $L_{sc} \leq x \leq L_{sc} + L_{ved}$  である。なお、皮膚各深度における濃度予測に必要な皮膚透過パラメータ ( $P_{tot}$ 、 $P_{ved}$ 、 $K_{sc}$ 、 $K_{ved}$ ) は、前章同様、皮膚透過挙動を2層膜と仮定し、算出した。

## 第2節 実験方法

### 2.1. 試薬

塩酸リドカイン (LID) および塩酸メピバカイン (MC) は Sigma Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.) から購入した。4-ヒドロキシ安息香酸 (HBA) および 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウムは東京化成株式会社 (東京、日本) から得た。また、酢酸アンモニウムは和光純薬株式会社 (大阪、日本) から購入した。その他の試薬および溶媒は、市販の液体クロマトグラフ用または特級品を精製せずにそのまま用いた。

### 2.2. 皮膚材料

食用三元豚のブタ耳 (LWD、6-12 月齢、雄および雌) は株式会社埼玉実験動物供給所 (埼玉、日本) から凍結状態で購入してそのまま保存し、実験時にその都度解凍して使用した。

### 2.3. 皮膚透過実験

ブタ耳は温水中 (32°C) で解凍し、pH7.4 PBS で清拭した後、外耳外側皮膚を剥離し full-thickness skin を得た。また、剥離前に清拭した外耳外側皮膚を粘着テープ (セロテープ<sup>®</sup>、ニチバン株式会社、東京、日本) を用いて、20 回 tape-stripping 処理して stripped skin を得た。両皮膚は真皮側の脂肪を取り除いた後、直ちに 32°C の水を循環させた縦型拡散セル (セルの拡散透過面積: 1.77 cm<sup>2</sup>) に挟んだ。ドナー側に pH7.4 PBS を 1.0 mL、レシーバー側に pH7.4 PBS を 6.0 mL 適用し、1 時間水和させた。水和後、ドナー側の PBS を取り除き、LID 溶液 (1000 µg/mL) を 1.0 mL 適用し、透過実験を行った。実験中は、レシーバー側のシンク状態を保つため、レシーバー溶液をマ



グネットスターラーで攪拌した。なお、LID 溶液は pH7.4 (分子形分率 28.5%) とした。経時的にレシーバー側から溶液を 500  $\mu$ L 採取し、同量の PBS を戻した。得られたサンプル溶液の LID 濃度は HPLC または LC/MS/MS を用いて測定した(2.5.)。

なお、実験をより簡素化する目的で、特に示さない限り、ドナー中化学物質濃度は適用濃度と等しいと仮定した。

## 2.4. 角層および生きた表皮・真皮各深度における濃度の測定方法

### 2.4.1. 角層各深度における濃度

角層中の LID 濃度の測定は N'Dri-Stempfer らの方法に準じて行った<sup>13)</sup>。pH7.4 のドナー溶液を適用した透過実験終了後、ドナー溶液を取り除き、PBS を用いて角層表面を洗浄した。なお、皮膚透過実験は、定常状態時に終了した。セロハンテープを用いて角層を剥離し、セロハンテープを PBS 1.0 mL に 1 時間浸すことにより角層中の LID を抽出した。抽出液中 LID は HPLC を用いて測定した(2.5.)。1 回の操作で剥離される単位面積当たりの角層量(角層数)は変動するため、経表皮水分損失(trans epidermal water loss, *TEWL*)を測定して角層厚  $L_{sc}$  を推定した。その操作を *TEWL* が一定値を示すまで繰り返して、角層が完全に除かれるまで行った。

以下に、角層厚の推定方法を示す。体内の水分は角層中を Fick の拡散則に従い拡散し、蒸発するとすると、*TEWL* は以下の式で示される。

$$TEWL = \frac{K_w D_w \Delta C}{L_{sc}} \quad (32)$$

ここで、 $K_w$  は水の角層-表皮細胞間分配係数、 $D_w$  は水の角層内での拡散定数、 $\Delta C$  は角層の最表部と最深部の水の濃度差、 $L_{sc}$  は角層厚である。厚さ  $x$  分だけ角層を剥離した後の *TEWL* は次式で表される。

$$TEWL = \frac{K_w D_w \Delta C}{L_{sc} - x} \quad (33)$$

角層の密度を  $1.0 \text{ g/cm}^3$  と仮定し<sup>49)</sup>、剥離面積を考慮すると、剥離された角層の累積質量を  $x$  に変換することができる。したがって、*TEWL* の逆数に対して  $x$  をプロットすると直線が得られ、 $x = 0$  の時を角層厚  $L_{sc}$  とした。

#### 2.4.2. 生きた表皮・真皮各深度における濃度

pH7.4 の LID 溶液を用いた full-thickness skin 透過実験の終了後、ドナー溶液を取り除き、PBS を用いて皮膚の両面を洗浄した。なお、皮膚透過実験は、定常状態時に終了した。その後、角層をセロハンテープで完全に剥がし、生きた表皮・真皮をドライアイスで凍らせた。次に、凍らせた皮膚をフェザー剃刃 S 両刃(フェザー安全剃刃、大阪、日本)を用いて皮膚表面に対して垂直に約 0.5 cm 四方に切り、川本法用凍結包埋剤(SCEM、ライカマイクロシステムズ、東京、日本)に包埋し、ドライアイスを入れたイソペンタン中で速やかに凍結させた。その後クライオスタット(CM3050S、ライカマイクロシステムズ、東京、日本)を用いて、100  $\mu\text{m}$  の水平皮膚切片を作成した。切り取った皮膚切片は、厚み 200  $\mu\text{m}$  毎にマイクロチューブに入れた。次に、皮膚の入ったマイクロチューブに PBS 1.0 mL を加え、1 時間かけて生きた表皮・真皮中の LID を抽出した。LID 溶液は LC/MS/MS を用いて測定した(2.5.)。

#### 2.5. 分析方法

**HPLC:** 皮膚透過実験で採取した LID を含むレシーバー溶液および角層から抽出したサンプルは、内部標準物質 HBA を溶解した acetonitrile と 1 : 1 の容積比で混和し、遠心分離(15000 rpm、5 min、4°C)によりタンパク除去後、上清中の LID 濃度を HPLC を用いて測定した。HPLC システムは system controller(CBM-20A; 島津製作所、京都、日本)、pump(LC-20AD; 島津製作所)、auto-sampler(SIL-20AC; 島津製作所)、column oven(CTO-20A; 島津製作所)、UV detector(SPD-M20A; 島津製作所)、

analysis software (LC solution; 島津製作所)を用いた。カラムは Inertsil<sup>®</sup> ODS-3 4.6 mm×150 mm (GL Sciences Inc.; 東京、日本)を、カラム温度は 40°C とした。移動相は 5 mM sodium 1-heptanesulfonate を含有した 0.1% phosphoric acid : acetonitrile = 7 : 3 を用い、流速 1.0 mL/min とした。また、injection volume は 20 µL とし、検出波長 UV 230 nm でピーク面積比を測定した。

LC/MS/MS: 皮膚透過実験で採取したレシーバー溶液および生きた表皮・真皮から抽出したサンプル中のLID濃度はLC/MS/MSを用いて測定した。内部標準物質であるMCを溶解したアセトニトリルと1 : 1の容積比で混和し、遠心分離(15000 rpm、5 min、4°C)によりタンパク除去後、上清中のLID濃度をLC/MS/MSに注入した。LC/MS/MSシステムはsystem controller (CBM-20A; 島津製作所)、pump (LC-20AD; 島津製作所)、auto-sampler (SIL-20AC<sub>HT</sub>; 島津製作所)、column oven (CTO-20A; 島津製作所)、detector (4000QTRAP; AB Sciex、東京、日本)、analysis software (Analyst<sup>®</sup> version 1.4.2; 島津製作所)からなる。カラムはShodex ODP2 HP-2B 2.0 mm×50 mm (昭和電工、東京、日本)を、カラム温度は40°Cとした。移動相は、10 mM ammonium acetate in water : acetonitrile = 7 : 3を用い、流速0.2 mL/minとした。また、injection volumeは10 µLに設定した。LIDおよびMCのイオン化には、electro spray ionization法を用い、イオンモードは陽性、測定分子量はLIDの場合235.21および86.1、MCの場合247.14および98.00とした。また、V<sub>cap</sub>電圧は5000 Vとし、ネブライザー圧力を40 psig、乾燥ガス流量を20 µL/min、乾燥ガス温度を500°Cの条件下でピーク面積比を測定した。

### 第3節 結果・考察

Figure 12 にブタ外耳皮膚の full-thickness skin および stripped skin を介した LID の累積皮膚透過量を示し、Table 5 に Fig. 12 で示した LID 透過挙動を Fick の拡散則に従う差分式で解析して得られた皮膚透過パラメータを示す。基剤から角層への分配係数  $K_{sc}$  と基剤から生きた表皮への分配係数  $K_{ved}$  の値はほぼ等しかった。この原因として、適用した LID 溶液の pH は 7.4 (分子形分率 28.5%) であり、分子形とイオン形が混在した状態で評価を行っているため、 $K_{sc}$  が低くなり、 $K_{sc}$  と  $K_{ved}$  の値が等しくなったと考えられた。

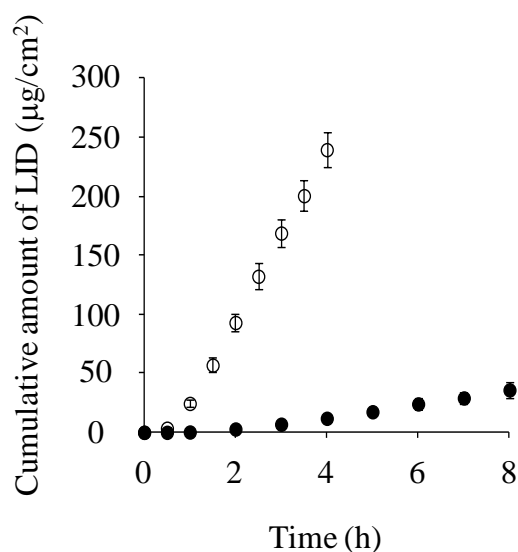


Fig. 12 Time courses of changes in the cumulative amounts of LID that permeated through the full-thickness skin and stripped skin. Symbols: ●: full-thickness skin, ○: stripped skin. Data are shown as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ).

Table 5 Skin permeation parameters of LID

	$P_{tot}$ (cm/s)	$P_{sc}$ (cm/s)	$P_{ved}$ (cm/s)	$K_{sc}$	$K_{ved}$
pH7.4 LID solution	$2.4 \times 10^{-6}$	$2.5 \times 10^{-6}$	$4.3 \times 10^{-5}$	7.2	7.3

Figure 13 に角層各深度における LID 濃度の実測値と計算値の関係を示す。テープストリッピングにより得た累積角層質量から単純に密度を 1 として求めた  $L_{sc}$  は  $12.5 \mu\text{m} \pm 0.6$  であり、 $TEWL$  の逆数に対して  $x$  をプロットして得た  $L_{sc}$  は  $12.7 \mu\text{m} \pm 0.8$  であり、どちらの方法でも角層厚は一致し、この値は、ブタ外耳外側皮膚の垂直切片から得られた角層厚 ( $13.7 \mu\text{m} \pm 1.0$ ) とほぼ一致した。したがって、 $TEWL$  を用いる方法の妥当性が示された。セロハンテープを用いた角層の剥離においては、1 回の操作で剥離される単位面積当たりの角層量 (角層数) が変動するため、Fig. 13a-c には角層各深度における濃度の実測値 3 例について 1 例ずつグラフに示し、Fig. 13d には各膜厚を全角層厚で normalized した全データをまとめて示す。定常状態皮膚透過時の角層中 LID 濃度は、深部に行くに従って低くなり、その挙動は直線性を示した。また、式 (30) を用いた角層各深度における LID 濃度の計算値は、3 例とも実測値とほぼ一致した。

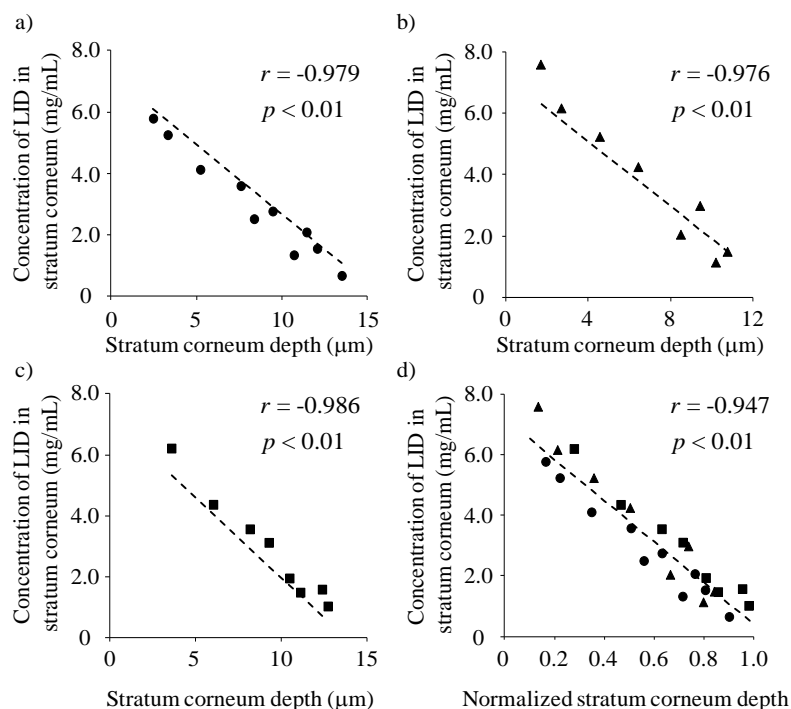


Fig. 13 Comparison of calculation value and observed value concentration-distance profiles of LID at steady-state in stratum corneum. a-c) Raw data for each stratum corneum. d) Normalized data for the all stratum corneum. Symbols •, ■ and ▲ show each set of data. Dashed line represents calculated using permeation parameters.

Figure 14 に生きた表皮・真皮各深度における LID 濃度の実測値と計算値の関係を示す。ブタ皮膚の生きた表皮・真皮の厚みが個体によって異なるため、Fig. 14a-e には生きた表皮・真皮各深度における濃度の実測値 5 例について 1 例ずつグラフに示し、Fig. 14f には各膜厚を生きた表皮・真皮厚で normalized した全データをまとめて示す。定常状態皮膚透過時の生きた表皮・真皮中 LID 濃度は、深部に行くに従って低くなり、その挙動はほぼ直線性を示した。また、式(31)を用いた生きた表皮・真皮各深度における LID 濃度の計算値は、5 例とも実測値とほぼ一致した。

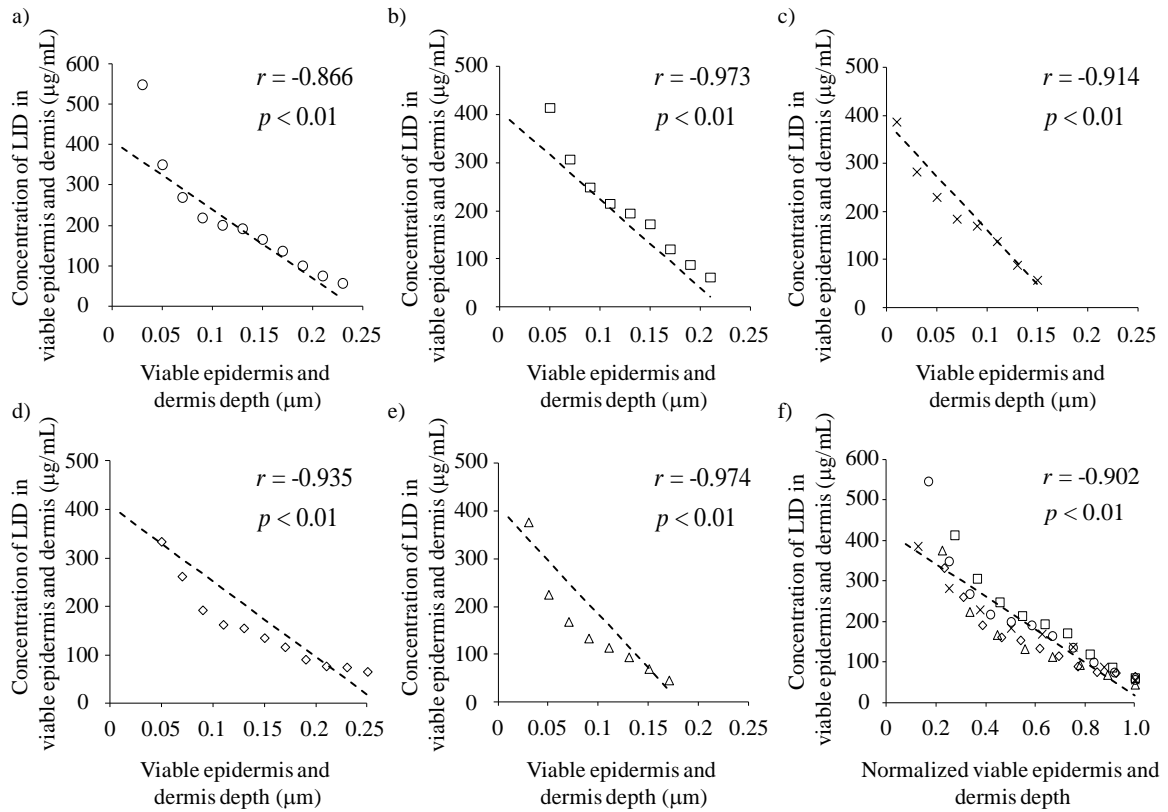


Fig. 14 Comparison of calculation value and observed value concentration-distance profile of LID at steady-state in viable epidermis and dermis. a-e) Raw data for each viable epidermis and dermis. f) Normalized data for the all viable epidermis and dermis. Symbols  $\circ$ ,  $\square$ ,  $\Delta$ ,  $\diamond$  and  $\times$  show each set of data. Dashed line represents calculated using permeation parameters.

Figure 15 に Fig. 13 および 14 のデータを合わせたグラフを示す。角層中濃度の濃度勾配(傾き)は生きた表皮・真皮中濃度の濃度勾配より大きく、Fig. 1 で示した皮膚を 2 層膜と仮定した時の concentration-distance profile と同様のグラフが得られた。また、実測した角層中の透過抵抗  $R_{sc}$  (Fig. 1b: point a および b の差)を実測した生きた表皮・真皮中の透過抵抗  $R_{ved}$  (Fig. 1b: point b)で除した値と、LID の生きた表皮・真皮中の透過係数  $P_{ved}$  を LID の角層中の透過係数  $P_{sc}$  で除した値は、それぞれ 0.061、0.058 とほぼ一致した(式(6)、式(7))。すなわち、皮膚中濃度から求めた角層と生きた表皮

真皮の透過抵抗比と皮膚透過性から求めた角層と生きた表皮真皮の透過抵抗比が理論に従い一致した。このことから、Fig. 1 に示した concentration-distance profile を作成する理論とそれを用いた解析は、皮膚透過性や皮膚中濃度予測に非常に有用であると考えられた。

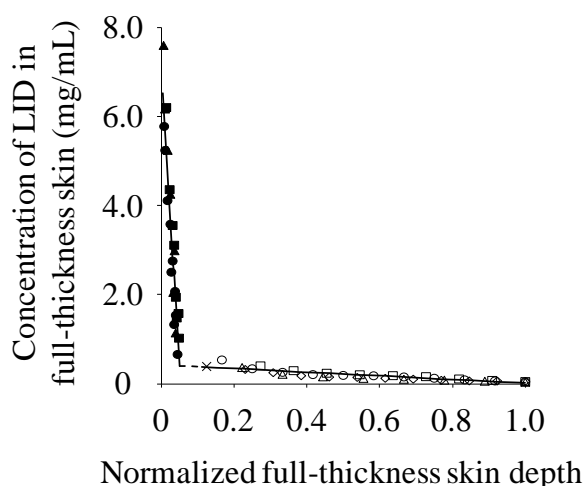


Fig. 15 Comparison of calculation value and observed value concentration-distance profile at steady-state in full-thickness skin. Symbols: as in Fig. 13 and 14. Continuous line is calculated using the permeation parameters.

皮膚局所作用を期待した外用医薬品や化粧品の有効性・安全性予測は、皮膚中濃度が重要であるが、その皮膚中での作用部位は様々である。例えば、色素沈着の原因であるメラニン生成は、生きた表皮の基底層にあるメラノソームと呼ばれる細胞小器官で行われる<sup>50)</sup>。したがって、メラニン生成を阻害するアルブチン<sup>51)</sup>やコウジ酸<sup>52)</sup>の有効性評価は、生きた表皮中濃度を測定する必要がある。また、抗しわ効果を示すビタミン A 関連化学物質(レチノイン、レチノイン酸)<sup>53)</sup>やグリコール酸<sup>54)</sup>の有効性は、真皮中濃度に左右される。したがって、目的部位に応じた皮膚各深度における濃度を測定することが大変重要である。



本章の研究でモデル化学物質として用いた LID の分子量は 234、オクタノール/水分配係数の対数値は 0.23 (32°C、溶媒:pH7.4 PBS) で、比較的皮膚透過性の高い薬物である<sup>55,56)</sup>。LID は主に局所麻酔薬または抗不整脈薬として用いられている薬物であるが、神経痛、手足のしびれ、かゆみ等の症状(病態によって部位が異なる)の改善を目的としてテープ剤として経皮適用されている。したがって、LID の皮内動態を評価することは大変重要である。

本章の研究では、皮膚透過パラメータを動物実験から求めたが、これらのうちいくつかの対応するヒトでのパラメータは化学物質の物理化学的性質から推定可能である<sup>21-27)</sup>。したがって、すべてのヒト皮膚透過パラメータについて化学物質の物理化学的性質から推測可能となれば、動物実験を行わずに本方法を用いて皮膚各深度における濃度がある程度予測可能であると考えられる。

## 第4節 小括

本章の研究において、*in vitro* 皮膚透過実験から得られた累積透過データを2層膜解析したところ、皮膚中平均濃度だけでなく<sup>48)</sup>、皮膚各深度における濃度も高精度に予測できた(Figs. 13-15)。したがって、化学物質の皮膚局所での有効性・安全性を効率よく評価できると考えられた。また、本章の研究ではLIDを使用して評価したが、経角層ルートを透過すると考えられる同様な化学物質( $M.W. < 500$ ,  $\log K_{o/w}$  0-3)を用いた場合で同様な方法で皮膚各深度における化学物質濃度を予測できると考えられる。

比較的親油性の高いLIDでは、角層実質の透過性が高いため、均一な2層膜として算出した皮膚各深度における濃度の予測式を用いて皮膚各深度を予測できたと考えられた。一方、親水性や分子量の高い化学物質は角層実質を透過しにくく<sup>55)</sup>、皮膚の付属器官や *hydrophilic pathway*<sup>27)</sup>の寄与を考えなくてはならない。すなわち、親水性や分子量の高い化学物質の皮膚中濃度の予測値は実測値と一致しない可能性がある<sup>57-59)</sup>。したがって、皮膚の付属器官や *hydrophilic pathway*<sup>27)</sup>を考えることにより、より多くの化学物質に適用可能な皮膚中濃度予測法について検討する必要があると考えられた。また、本研究では定常状態時の皮膚中濃度を予測したが、化学物質の適用初期における皮膚内濃度を評価するためには、非定常状態時にも利用可能となる簡便な予測法を確立する必要があると思われる。

以上をまとめると、皮膚透過データを拡散則に従い解析することで、親油性化学物質については皮膚各深度における濃度が容易に予測可能であると示された。本方法は、実験動物数の削減に有効だけでなく、外用医薬品や化粧品の製剤設計を効率的に進める手段として用いることができると考えられる。

### 第3章 単純な Fick の拡散則では説明がつかない化学物質の皮膚透過パラメータと皮膚中濃度の予測

第1章、第2章では、比較的皮膚を通りやすいと考えられる物理化学的性質を持つ化学物質を選択し検討を行った。本章の研究では、第1章、第2章の皮膚中濃度予測式がより広範囲の化学物質に利用可能であるか検討を行った。

化学物質の皮膚透過挙動のほとんどは、Fick の拡散則で説明可能な物理的現象であると考えられ、これまで多くの研究者が拡散速度論を用いて皮膚吸収の特徴を論じてきた。一般に、化学物質の皮膚透過では、皮膚最外層にある角層が大きなバリアを担っている。角層は死んだ組織であるため、角層透過にはトランスポーターなどの寄与は極めて少ない。当然、化学物質の full-thickness skin 透過性は、stripped skin 透過性より低くなる。また、化学物質を full-thickness skin に適用した時の生きた表皮・真皮中濃度は、一般に低い。もし、透過方向を逆にした場合、これとは異なった条件を作り出すことが可能である。すなわち、皮膚透過性は透過方向（表皮→真皮透過性、真皮→表皮透過性）が異なっても等しくなるが、その一方で、真皮→表皮透過方向の皮膚中濃度は表皮→真皮透過方向の皮膚中濃度より高くなる。そのような条件を設定することは、各透過パラメータの各濃度依存性やモデルの適用範囲を知る上で意味があると思われる。またさらに、真皮→表皮透過方向における皮膚中濃度分布への理解は、化学物質の全身循環から皮膚中移行時の解析にもつながると思われる。そこで本章では、真皮→表皮透過の実験を行って比較することとした。

前章の小括でも述べたが、第1章、第2章で示した予測法が、より広い範囲の化学物質に単純に適用できるかは疑わしい。例えば、第1章の予備検討で full-thickness

skin 透過速度より stripped skin 透過速度が低い化学物質が存在した。この皮膚透過挙動について、式(26)、式(27)を用いて皮膚透過パラメータを算出することはできない。これら特異な皮膚透過挙動の理由を解明し、化学物質の皮膚透過もしくは皮膚中濃度を正確に測定することが、それらの予測を確かなものにしていく上で必要になると考えられる。そこで、本章では、予備検討で異常な透過が観察された化学物質を含む  $\log K_{o/w}$  ( $K_{o/w}$  は *n*-オクタノール-水分配係数) や *M.W.* の異なる化学物質(パラベン類、フルオレセインデキストラン、硝酸イソソルビド)を選択し、それらのヘアレスラット摘出皮膚透過挙動より、Fick の拡散則で説明がつかない化学物質の特徴とその原因について試験調査し、Fick の拡散則で説明がつかない化学物質の皮膚中濃度の予測法について考察を行った。

## 第1節 皮膚透過の方向依存性における理論

Figure 16a, b に full-thickness skin と stripped skin を介した定常状態時の化学物質移動を表す典型的な concentration-distance profile を示す。第2章でも述べたように皮膚は、死んだ細胞からなる角層バリアと生きた細胞からなる表皮・真皮バリアのそれぞれ均一な拡散抵抗を表す2層からなる拡散モデルとしてとらえられる。前述したように、角層が、化学物質透過の最大のバリアであるため、full-thickness skin (Fig. 16a) 透過性(図中の矢印の中でも模式的示した)は、stripped skin (Fig. 16b) 透過性より著しく低くなる。

Figure 16c, d に表皮側に親油性化学物質を適用した後の表皮→真皮透過 (Fig. 16c) と真皮側に化学物質を適用した後の真皮→表皮透過 (Fig. 16d) を表す concentration-distance profile を示す。

同様に、Fig. 16e, f に表皮側に親水性化学物質を適用した後の表皮→真皮透過 (Fig. 16e) と真皮側に化学物質を適用した後の真皮→表皮透過 (Fig. 16f) を表す concentration-distance profile を示す。

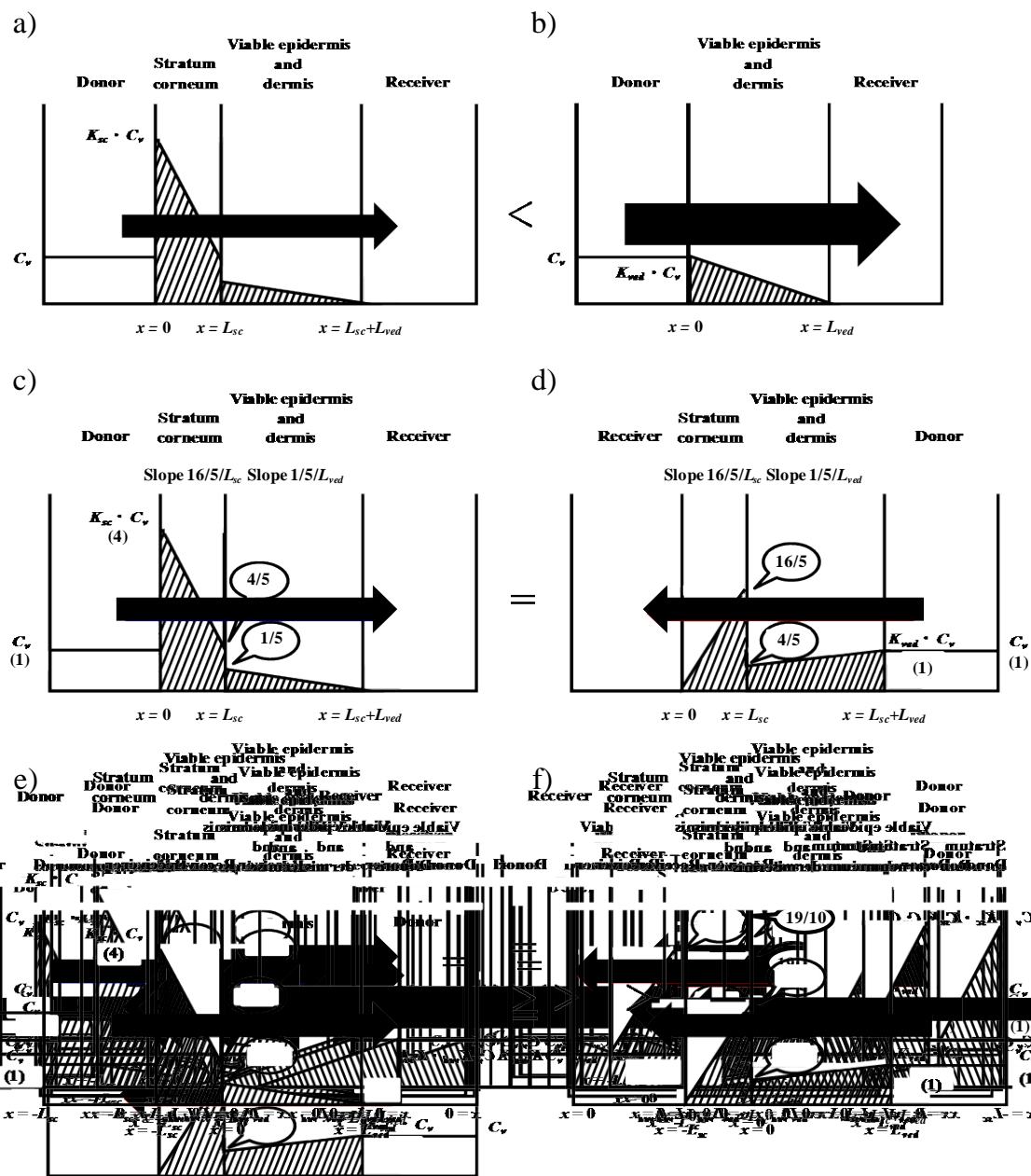


Fig. 16 Concentration-distance profiles showing permeation of a compound through full-thickness skin (a) and stripped skin (b), and full-thickness skin permeation of a lipophilic or hydrophilic compound in epidermis-to-dermis (c, e) and dermis-to-epidermis directions (d, f). Width of arrows corresponds to skin permeation rate.

ここで、full-thickness skinを介した表皮→真皮透過性と真皮→表皮透過性が等しくなることを説明する。Figure 16の定常状態におけるconcentration-distance profileにおいて、横軸は膜の厚さを、縦軸は皮膚に適用した化学物質の濃度を表し、図中の斜線部で示した面積が適用単位面積当たりの化学物質量(例えば $\mu\text{g}$ で示される)に相当する。角層および生きた表皮・真皮部位の化学物質濃度の傾き、すなわち濃度勾配とその層中の拡散係数の積が、透過速度であり、その値は全ての位置で等しい。Figure 16cに示すように親油性化学物質の基剤から角層への分配係数を4、基剤から生きた表皮・真皮への分配係数を1とすると、原則的に角層から生きた表皮・真皮への分配係数は1/4、生きた表皮・真皮から角層への分配係数は4となる。また、全皮膚抵抗に対する角層の抵抗寄与率を80%、生きた表皮・真皮の抵抗寄与を20%と仮定し、さらに、皮膚に適用した化学物質濃度を1、レシーバー側がシンク状態を保っていると仮定すると、Fig. 16c, dで示す化学物質の表皮→真皮、真皮→表皮の両透過方向とも角層中の濃度勾配は $16/5/L_{sc}$ となり、生きた表皮・真皮の濃度勾配は $1/5/L_{ved}$ となる。また、Fig. 16e, fで示すように親水性化学物質の基剤から角層への分配係数を2、基剤から生きた表皮・真皮への分配係数を1とし、全皮膚抵抗に対する角層の抵抗寄与率を95%、生きた表皮・真皮の抵抗寄与を5%と仮定する。同様な計算により、Fig. 16e, fで示す化学物質の表皮→真皮、真皮→表皮の両透過方向とも、角層の濃度勾配は $19/10/L_{sc}$ となり、生きた表皮・真皮の濃度勾配は $1/20/L_{ved}$ となる。すなわち、表皮側に化学物質を適用しても、真皮側に化学物質を適用しても角層および生きた表皮・真皮中の化学物質の濃度勾配が等しくなるため、皮膚を介する透過速度は透過方向に関係なく等しくなる。なお、stripped skinの場合は、生きた表皮・真皮を1層膜と考えられるため、表皮→真皮透過性と真皮→表皮透過性が等しくなるのは明らかである。

なお、両透過方向の皮膚中濃度を考えると、親油性化学物質の場合、Fig. 16 の比

率とは異なるが、角層厚を 1、生きた表皮・真皮厚を 9 とすると、表皮→真皮方向の透過時の皮膚中濃度は 0.33 となり、真皮→表皮方向の透過時の皮膚中濃度は 0.97 となる。親水性化学物質の場合も同様に、角層厚を 1、生きた表皮・真皮厚を 9 とすると表皮→真皮方向の透過時の皮膚中濃度は 0.13 となり、真皮→表皮方向の透過時の皮膚中濃度は 0.97 となる。したがって、皮膚中濃度は透過方向によって異なる。これらのことから明らかなように、皮膚への吸着、皮膚中代謝、トランスポーター介在皮膚透過がない限り、化学物質の透過量は表皮→真皮、真皮→表皮の両方向で等しくなる。一方で、皮膚中濃度は表皮→真皮、真皮→表皮の両方向で異なり、透過方向を変えることによって皮膚中濃度が大きく異なるモデルを作ることができ、この時の理論の適用性を評価することは、第 1 章および第 2 章で行ってきた研究の信頼性を検証することに使える。さらに、真皮→表皮透過方向の皮膚中濃度分布を理解することは、全身循環から皮膚中に移行する化学物質の評価につながると考えられる。



## 第2節 実験方法

### 2.1. 試薬

モデル透過化学物質として用いたメチルパラベン(MP)、エチルパラベン(EP)、プロピルパラベン(PP)、ブチルパラベン(BP)、ペンチルパラベン(PeP)および硝酸イソソルビド(ISMN)は、東京化成株式会社(東京、日本)から購入した。フルオレセインデキストラン (FD-4)は、Sigma Aldrich(St. Louis、MO、U.S.A.)から購入した。Table 6に各モデル透過化学物質の分子量(*M.W.*)と*n*-オクタノール/水分配係数( $\log K_{o/w}$ )を示す。エステラーゼ阻害薬であるフルオロリン酸ジイソプロピル(DFP)は、和光純薬工業株式会社(大阪、日本)から購入した。その他の試薬および溶媒は、市販の液体クロマトグラフ用または特級品を精製せずにそのまま用いた。

Table 6 Physicochemical properties of model compounds

	MP	EP	PP	BP	PeP	FD-4	ISMN
<i>M.W.</i>	152.2	166.1	180.2	194.2	208.3	4400	191.1
$\log K_{o/w}$ a)	1.93	2.27	2.81	3.53	4.10	-0.773	-0.151

a) *n*-Octanol/water partition coefficient at 37°C.

### 2.2. 実験動物およびヒト皮膚材料

体重220-260 gの雄性ヘアレスラット(WBN/ILA-Ht系)は、城西大学生命科学研究センター(埼玉、日本)または石川実験動物研究所(埼玉、日本)から購入した。ヘアレ

スラットは、 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ に調節され12時間ごとに明暗サイクル(on、off時間:7:00-19:00)を設定した部屋で飼育した。水と餌は自由に摂取可能とした。なお、動物実験は、城西大学動物実験管理委員会の承諾(No.: H1813, H22066, H23052)を得た後、城西大学実験動物規定に従って行った。

ヒト頭部皮膚はBiopredic International (Rennes, France)より購入した。本実験で用いたヒト頭部皮膚は白人女性、60歳、皮膚の厚みは4 mmであった。なお、ヒト皮膚実験は、KAC Co., Ltd. (滋賀、日本)のヒト組織由来製品の倫理・安全性委員会の承諾を得た後、規定に従って行った。

### 2.3. 皮膚透過実験

Full-thickness skinは、ペントバルビタール麻酔下(50 mg/kg, *i.p.*)で、水を湿らせたキムワイプでヘアレスラットの腹部皮膚を清拭してから摘出した。Stripped skin透過性に用いた皮膚は、清拭した腹部皮膚を粘着テープ(セロテープ<sup>®</sup>、ニチバン株式会社、東京、日本)を用いて、20回tape-stripping処理を行った後、摘出した。なお、化学物質の皮膚透過性に及ぼす部位差の影響を少なくするため、左右上腹部のみを用いた。摘出した皮膚は真皮側の脂肪を取り除いた後、直ちに $32^{\circ}\text{C}$ の水を循環させた縦型拡散セル(セルの拡散透過面積: $1.77\text{ cm}^2$ )に挟んだ。エステル構造を有するパラベン類は、皮膚中に存在するエステラーゼによって代謝されてしまうため、エステラーゼ阻害剤であるDFPを溶解したpH7.4のPBS ( $2.7\text{ }\mu\text{mol/mL}$ ) 6.0 mLを摘出した皮膚に30分間適用し、その後、DFP溶液を取り除いてパラベン類の透過実験を行った。なお、DFPが化学物質の透過性に影響しないことは確認済みである<sup>32,41,42)</sup>。すなわち、ドナー側に化学物質を溶解させたPBSまたは3% EtOH 0.5 mLもしくは1.0 mLを、レシーバー側にDFPを溶解したPBS ( $0.54\text{ }\mu\text{mol/mL}$ )を6.0 mL適用し、透過実験を行った。各化学物質の適用濃度はMP:  $1520\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、EP:  $500\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、PP:  $200\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、BP:  $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、

PeP: 50 µg/mL、FD-4: 1.0 mg/mL、ISMN: 100 mg/mLとした。また、エステル構造を持たない化学物質は、DFP処理を行わず、pH7.4 PBSを1時間適用し、皮膚水和を行い、透過実験を行った。実験中は、レシーバー側のシンク状態を保つため、レシーバー溶液をマグネットスターラーで攪拌した。経時的にレシーバー側から溶液を500 µL採取し、同量のPBSを戻した。得られたサンプル溶液の化学物質濃度はHPLCまたは蛍光分光光度計を用いて測定した(2.4.)。

ヒト頭部皮膚は、髪の毛をハサミで切り取り、水を湿らせた脱脂綿を用いて皮膚中に残存する血液を取り除いてから縦型拡散セルにセットし、12時間水和後、ISMNの透過実験を行った。なお、ISMNの適用濃度、その他の透過実験条件はヘアレスラット皮膚と同様に行った。

なお、実験をより簡素化する目的で、特に示さない限り、ドナー中化学物質濃度は適用濃度と等しいと仮定した。

## 2.4. 分析方法

パラベン類は、EP、MP、BP、PP、BPをそれぞれMP、EP、PP、BP、PePの内部標準物質とし、採取した試料溶液を内部標準物質を溶解したアセトニトリルと1:1の容積比で混和した。その後、遠心分離(15000 rpm、5 min、4°C)によりタンパク除去後、得られた上清中のパラベン類濃度をHPLCを用いて測定した。HPLCシステムはsystem controller(CBM-20A; 島津製作所、京都、日本)、pump(LC-20AD; 島津製作所)、auto-injector(SIL-20AC; 島津製作所)、column oven(CTO-20A; 島津製作所)、UV detector(SPD-M20A; 島津製作所)、analysis software(LC solution; 島津製作所)を用いた。カラムはLiChroCART® 250-4(KGaA; 64271; Merck, Darmstadt, Germany)を、カラム温度は40°Cとした。移動相はMPおよびEPの場合、0.1% phosphoric acid : acetonitrile = 65 : 35、PPおよびBPの場合、0.1% phosphoric acid : acetonitrile = 55 :

45、PeP の場合、0.1% phosphoric acid : acetonitrile = 45 : 55 を用い、流速は 1.0 mL/min とした。また、injection volume は 20  $\mu$ L にし、検出波長 UV 260 nm でピーク面積比を測定した。

ISMN は、acetonitrile と 1 : 1 の容積比で混和し、遠心分離 (15000 rpm、5 min、4°C) によりタンパク除去後、上清を HPLC によって測定した。なお、ISMN は絶対検量線法によって定量した。カラムは Inertsil<sup>®</sup> ODS-34.6 mm $\times$ 150 mm (GL Sciences Inc.、東京、日本) を用い、移動相は water : acetonitrile = 90 : 10 を用い、検出波長 UV 220 nm でピーク面積を測定した。その他、HPLC システムおよび測定条件はパラベン類と同様である。

FD-4濃度は、蛍光分光光度計 (RF-5300PC; 島津製作所) を用いて励起波長425 nm、蛍光波長525 nmの条件下で測定した。

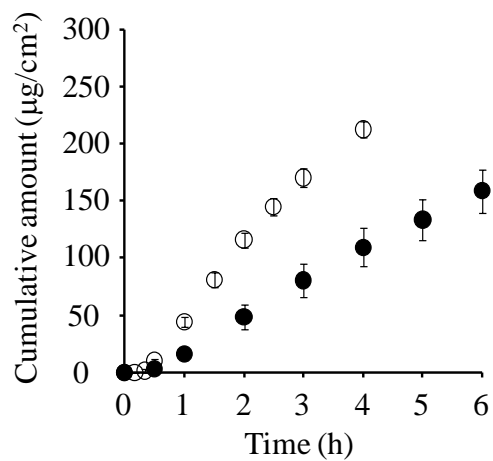
## 2.5. 皮膚凍結切片

透過実験終了後、皮膚表面をPBS 1.0 mLで2回洗浄した。その後、縦型拡散セルから外した皮膚はフェザー剃刃S両刃(フェザー安全剃刃、大阪、日本)を用いて皮膚表面から垂直に約0.2 mm厚に切り、川本法用凍結包埋剤 (SCEM、ライカマイクロシステムズ、東京、日本) に包埋し、ドライアイスを入れたイソペンタン中で速やかに凍結させた。その後クライオスタット (CM3050S、ライカマイクロシステムズ、東京、日本) を用いて、垂直方向の皮膚凍結切片 (厚さ10  $\mu$ m) を作成した。作成した皮膚凍結切片は共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Scope: Fluoview FV1000 and software: FV10-ASW; オリンパス、東京、日本) を用いて観察した。

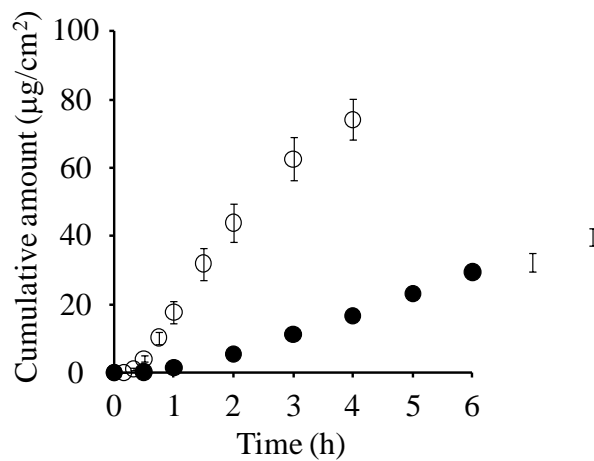
### 第3節 結果・考察

Figure 17にパラベン類の累積皮膚透過量の経時変化を示す。それぞれの皮膚透過挙動は典型的なlag timeとその後の定常状態時の透過速度を示したが、透過率の高いものではlag time後の透過速度が経時的に減少していくことも確認された。これはdonor側の化学物質量の減少が大きいいため、皮膚中の濃度勾配が経時的に減少することに起因する。また、 $\log K_{o/w}$ が1.93から2.81のMPからPPまでは、第1章においても示したようにstripped skin透過速度はfull-thickness skin透過速度に比べて十分高かった (Fig. 17a-c)。一方、 $\log K_{o/w}$  3.53のBPではfull-thickness skin透過速度とstripped skin透過速度差は少なかった (Fig. 17d)。このことから少なくとも $\log K_{o/w}$ が3.53以上の化学物質では、lipophilic membraneである角層を容易に透過し、全体の皮膚透過性は角層バリアよりも生きた表皮・真皮バリアに大きく影響を受けると考えられた。一方、Fig. 17eに示すPePのstripped skin透過速度はfull-thickness skin透過速度よりも低くなった。BPに見られたようにfull-thickness skin透過速度とstripped skin透過速度が等しくなることは理論上起りえるが、PePに見られたように、stripped skin透過速度がfull-thickness skin透過速度より低くなることは理論上起りえない。

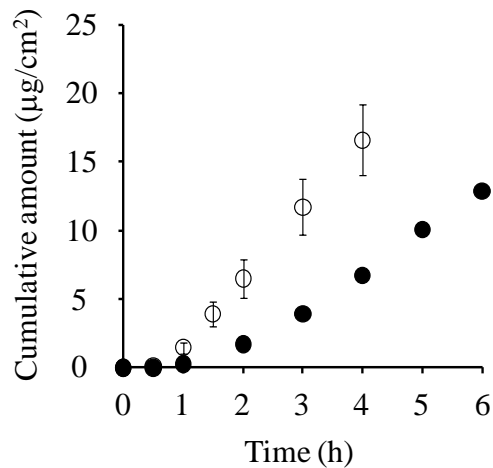
a) MP: 1520  $\mu\text{g/mL}$



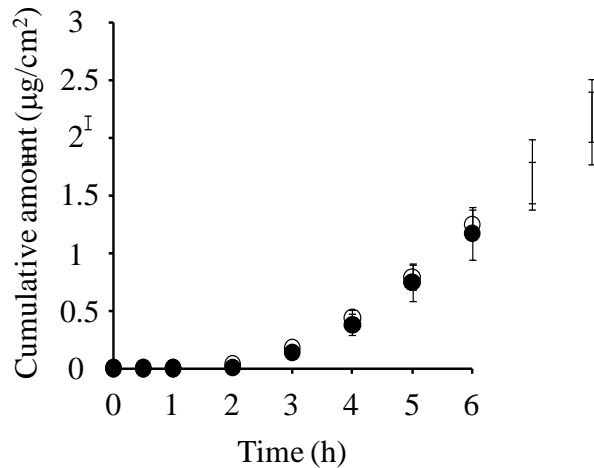
b) EP: 500  $\mu\text{g/mL}$



c) PP: 200  $\mu\text{g/mL}$



d) BP: 100  $\mu\text{g/mL}$



e) PeP: 50  $\mu\text{g/mL}$

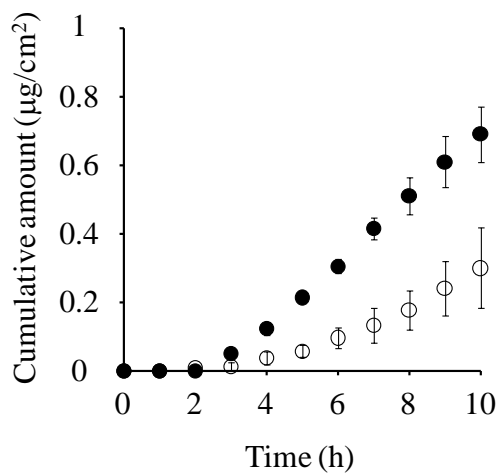


Fig. 17 Time course of changes in the cumulative amount of parabens that permeated through hairless rat skin. Symbols: through full-thickness skin from PBS (●), through stripped skin from PBS (○). Data are shown as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3-5$ ).

この原因として、皮膚とドナー溶液間に移動抵抗を有する層、すなわち界面抵抗層や非攪拌層が存在するのではないかと考えた<sup>60-66</sup>。通常、基剤から皮膚への分配は一瞬のうちに起こるとされているが<sup>34</sup>、界面抵抗があることで見かけ上、分配に時間がかかると考えられる。そこで、このような場合、基剤と皮膚表面の親和性を高くすることで、界面抵抗の影響を小さくすることが可能であるので、ドナー溶液とレシーバー溶液にEtOHを3%加えて、PePの皮膚透過実験を行った。また、比較対象化学物質としてMPを選択し、皮膚透過実験を行った。

その結果をFig. 18に示す。PBSをドナー溶媒とした場合と、3% EtOH溶液をドナー溶媒とした場合では、MPのfull-thickness skin透過速度とstripped skin透過速度ともに等しかった。EtOHには皮膚透過促進作用があると報告されている<sup>67-69</sup>が、今回用いた低濃度、すなわち3% EtOH溶液ではMPの皮膚透過促進作用はほとんどないと考えられた。一方、PePの場合、3% EtOH溶液を用いたfull-thickness skin透過速度はMP同様、PBS溶液を用いたfull-thickness skin透過速度と変わらなかったのに対し、3% EtOH溶液を用いたstripped skin透過速度は、PBS溶液を用いたstripped skin透過速度より高くなった。その結果として、3% EtOH溶液を用いると、この逆転現象は起こらなかった (Fig. 18b)。

以上より、3% EtOH溶液を用いることで、基剤と皮膚表面の親和性が改善され、界面抵抗の影響が小さくなったと考えられた。また、stripped skinの透過速度が変化したことから、界面抵抗は、基剤-角層間に現れるのではなく、基剤-生きた表皮間に現れると考えられた。なお、溶液適用時の界面抵抗がもし非攪拌水層によるものであったなら、EtOHを用いることなく良く攪拌することによって非攪拌水層の膜厚を小さくし、結果として、界面抵抗を少なくすることも可能となる。

溶解拡散膜中の化学物質の拡散は分子サイズが影響する速度論的過程であるが、一方で、分配現象は瞬時に起こり、平衡論的な現象である。このことは、化学工学分析でもよく知られている<sup>70,71)</sup>。また、以前より、化学物質の皮膚透過現象を取り扱ういくつかの論文にも非攪拌層もしくは界面抵抗を理論に組み込むことの有用性が提唱されている<sup>60-66)</sup>。これまでの多くの研究者によって、親油性が極端に高い化学物質を含む製剤中にEtOHを加えることで有効成分の皮膚透過性が向上することが示されている<sup>67-69)</sup>が、何故かについては十分説明されていなかった。本章の研究結果より、親油性が極端に高い化学物質の親水性基剤からの皮膚透過性には非攪拌層もしくは界面抵抗を考慮する必要がある、また、基剤中にEtOHを加えることで非攪拌層もしくは界面抵抗の影響を小さくすることが可能であることが示唆され、このこともEtOHの効果の一部に寄与していることが考えられた。

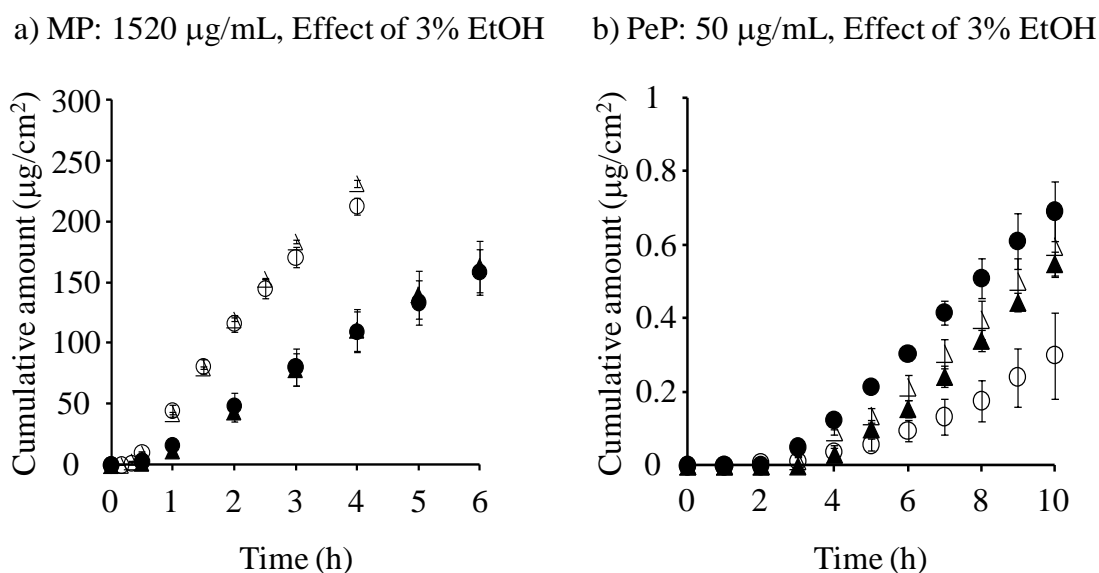


Fig. 18 Time course of changes in the cumulative amounts of MP (a) and PeP (b) that permeated through hairless rat skin. Symbols: through full-thickness skin from PBS (●), through stripped skin from PBS (○), through full-thickness skin from 3% EtOH (▲), through stripped skin from 3% EtOH (Δ). Data are shown as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3-5$ ).



そこで次に、表皮→真皮透過性と真皮→表皮透過性の違いについて評価した。Figure 19 に PBS または 3% EtOH 溶液を用いた PeP 累積皮膚透過量の経時変化を示す。ドナー溶液、レシーバー溶液ともに PBS を用いた場合、full-thickness skin を介する PeP の表皮→真皮透過速度は full-thickness skin を介する真皮→表皮透過速度、stripped skin を介する表皮→真皮透過速度、stripped skin を介する真皮→表皮透過速度の何れよりも高かった。また、full-thickness skin を介する PeP の真皮→表皮透過速度、stripped skin を介する表皮→真皮透過速度、stripped skin を介する真皮→表皮透過速度はすべて等しかった。この原因として、前述した化学物質の界面抵抗の影響が考えられた。そこで、ドナー溶液とレシーバー溶液に 3% EtOH 溶液を用いたところ、full-thickness skin の PeP の表皮→真皮、真皮→表皮透過速度と stripped skin の表皮→真皮、真皮→表皮透過速度は、すべて等しくなった。

したがって、PeP の場合は、真皮の裏側と化学物質溶液間の界面抵抗や非攪拌層なども皮膚透過性に影響を及ぼしていると考えられた。すなわち、親水性の膜である生きた表皮・真皮のどちらの側でも PBS のドナー溶液を適用すると透過速度が小さくなることから、親油性化学物質の水溶液と皮膚間の界面抵抗は、親水性の皮膚 (stripped skin) の両側で生じると考えられた。一方、full-thickness skin を介する表皮→真皮透過速度に界面抵抗が影響しなかった原因は、角層が親油性の膜であり、化学物質との親和性が高いためであると考えられた。したがって、非攪拌水層は高い親油性化学物質の膜への分配により、界面の溶液側の濃度が低下する現象であるので、今回観察された界面での抵抗は、非攪拌水層の存在によるものではなく、界面反応に関係する狭義の界面抵抗によるものと考えられる。

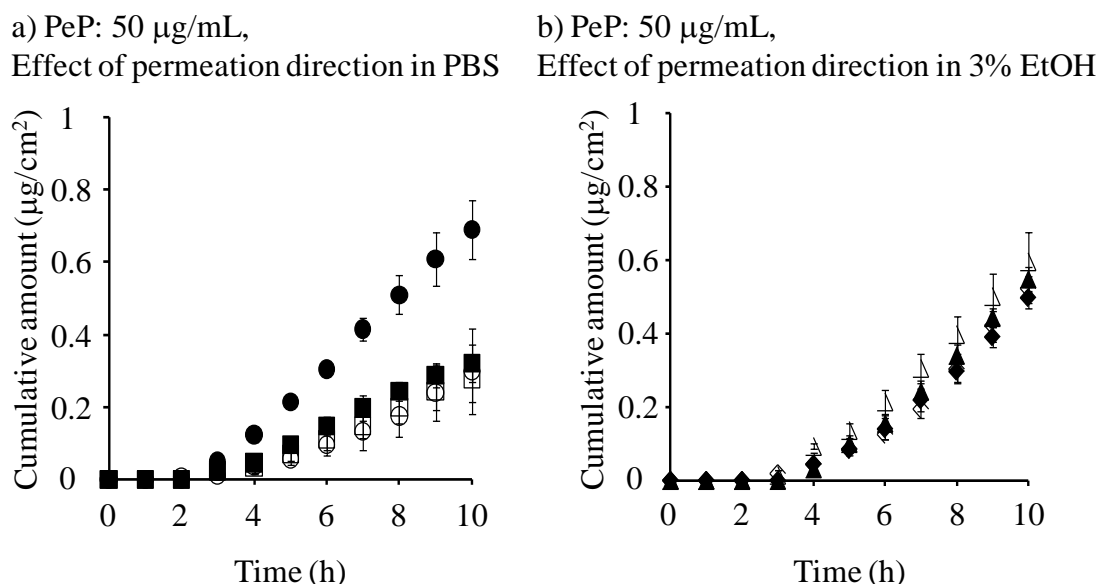


Fig. 19 Time course of changes in the cumulative amount of PeP that permeated through hairless rat skin from PBS (a) and 3% EtOH (b). Symbols: full-thickness skin permeation in the epidermis-to-dermis direction from PBS (●), stripped skin permeation in the epidermis-to-dermis direction from PBS (○), full-thickness skin permeation in the dermis-to-epidermis direction from PBS (■), stripped skin permeation in the dermis-to-epidermis direction from PBS (□), full-thickness skin permeation in the epidermis-to-dermis direction from 3% EtOH (▲), stripped skin permeation in the epidermis-to-dermis direction from 3% EtOH (△), full-thickness skin permeation in the dermis-to-epidermis direction from 3% EtOH (◆), stripped skin permeation in the dermis-to-epidermis direction from 3% EtOH (◇). Data are shown as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3-5$ ).

Figure 20にPBSまたは3% EtOH溶液からのMP累積皮膚透過量の経時変化を示す。PBSを用いた場合、stripped skinを介したMPの表皮→真皮、真皮→表皮透過速度は等しかった。しかし、full-thickness skinを介したMPの表皮→真皮透過速度は真皮→表皮透過速度より高かった。この原因として、MPでも界面抵抗の影響が疑われるので、3% EtOH溶液を用いてPePと同様の透過実験を行った。しかし、stripped skinを介したMPの皮膚透過速度は、PBS同様、表皮→真皮、真皮→表皮透過速度ともに等しかつ

たのに対し、full-thickness skinを介した表皮→真皮透過速度は真皮→表皮透過速度より高かった。すなわち、PBSと3% EtOHを用いたMPの透過速度が等しかったことから、この原因は界面抵抗ではないと考えられた。また、トランスポーター介在輸送の関与については<sup>72,73)</sup>、MPのトランスポーターは報告されていないこと、また、stripped skinの表皮→真皮、真皮→表皮透過速度が等しかったことから、考えられなかった。そこで、その他の原因として、MPの真皮への大きな移行量による適用溶液中有効濃度の減少を考え、累積皮膚透過量を透過実験終了後のドナー化学物質質量で補正した<sup>74,75)</sup>。その結果をFig. 21に示す。Full-thickness skinを介するMPの表皮→真皮、真皮→表皮透過速度は、理論と一致して等しくなった。以上より、MPの場合は、MPの真皮への大きな移行量による適用溶液中有効濃度の減少が透過速度に影響していると考えられた。

PePの場合、3% EtOHを加えること、MPの場合、透過実験終了後のドナー化学物質質量で補正することで、それぞれ皮膚透過速度理論と実測した皮膚透過速度が一致した。このことから、実験方法の工夫を行えば、第1章、第2章の方法で皮膚中濃度の予測が可能であると考えられる。ただし、MPのドナー溶液の急激な減少が皮膚中成分への吸着であったならば、第1章、第2章の方法では吸着を考慮していないので、真皮中濃度を過小評価することになると考えられた。この点については、今後の検討が必要であると思われる。

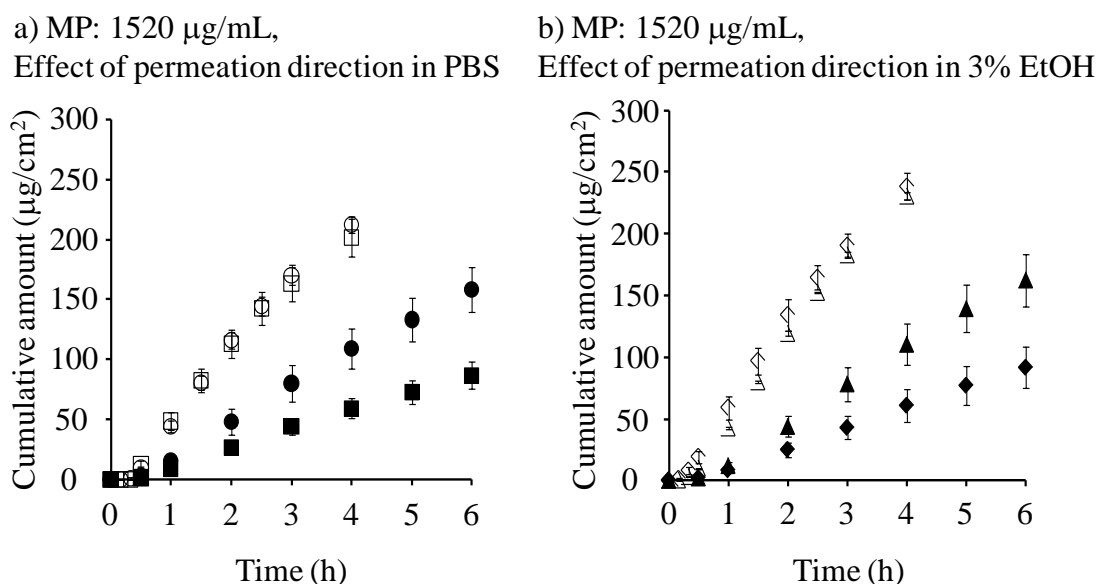


Fig. 20 Time course of changes in the cumulative amount of MP that permeated through hairless rat skin from PBS (a) and 3% EtOH (b). Symbols: full-thickness skin permeation in the epidermis-to-dermis direction from PBS (●), stripped skin permeation in the epidermis-to-dermis direction from PBS (○), full-thickness skin permeation in the dermis-to-epidermis direction from PBS (■), stripped skin permeation in the dermis-to-epidermis direction from PBS (□), full-thickness skin permeation in the epidermis-to-dermis direction from 3% EtOH (▲), stripped skin permeation in the epidermis-to-dermis direction from 3% EtOH (△), full-thickness skin permeation in the dermis-to-epidermis direction from 3% EtOH (◆), stripped skin permeation in the dermis-to-epidermis direction from 3% EtOH (◇). Data are shown as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3-5$ ). Data are shown as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ).

MP: 1520  $\mu\text{g/mL}$ , Normalized data

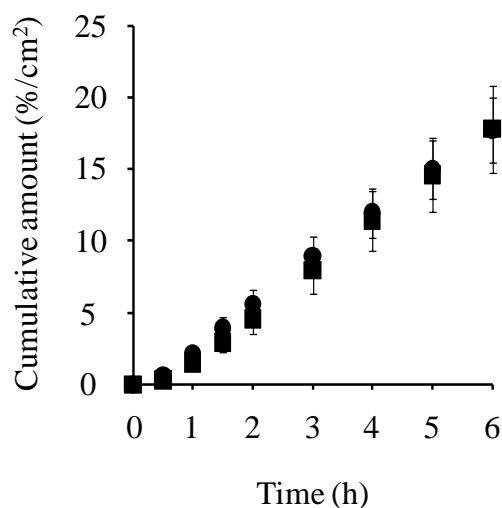


Fig. 21 Time course of changes in the normalized cumulative amount of MP that permeated through hairless rat skin. Symbols: full-thickness skin permeation in the epidermis-to-dermis direction from PBS (●), full-thickness skin permeation in the dermis-to-epidermis direction from PBS (■). Data are shown as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ).

さらに、親水性化学物質についても、表皮→真皮透過速度と真皮→表皮透過速度が等しくなるか検討した。Figure 22に親水性低分子であるISMNのfull-thickness skinを介した累積皮膚透過量の経時変化(a)およびstripped skinを介した累積皮膚透過量の経時変化(c)を示し、Fig. 23に親水性高分子であるFD-4のfull-thickness skinを介した累積皮膚透過量の経時変化(a)およびstripped skinを介した累積皮膚透過量の経時変化(c)を示す。Figure 22c, 23cに示すようにstripped skinの場合、FD-4、ISMNの表皮→真皮透過速度と真皮→表皮透過速度は、共に等しかった。一方、Fig. 22a, 23aに示すようにfull-thickness skinを介する透過速度は、FD-4、ISMN共に、表皮→真皮透過速度が真皮→表皮透過速度より高かった。FD-4とISMNの透過速度においてもMPと同様な原因を疑い、FD-4、ISMNの累積透過量を透過実験終了後のドナー化学

物質質量で補正した。その結果をFig. 22b, 23bに示す。FD-4、ISMNは、MPと異なりドナー化学物質質量で補正しても、表皮→真皮透過速度と真皮→表皮透過速度は異なった。以上より、別な原因について考える必要があると考えられた。

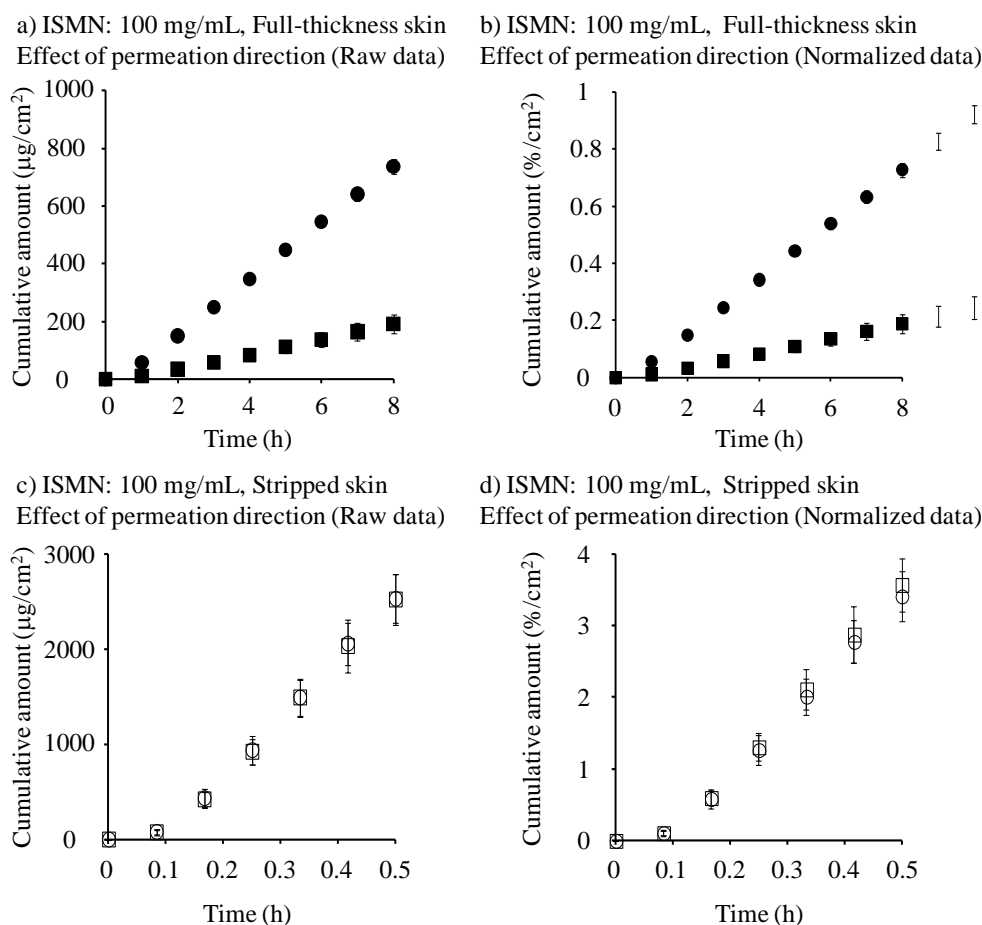


Fig. 22 Time course of changes in the cumulative amounts of ISMN permeated through full-thickness (a, b) skin and stripped skin (c, d). (a) and (c) are raw data ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), and (b) and (d) are normalized data ( $\%/ \text{cm}^2$ ). Symbols: full-thickness skin permeation in the epidermis-to-dermis direction from PBS ( $\bullet$ ), full-thickness skin permeation in the dermis-to-epidermis direction from PBS ( $\blacksquare$ ), stripped skin permeation in the epidermis-to-dermis direction from PBS ( $\circ$ ), stripped skin permeation in the dermis-to-epidermis direction from PBS ( $\square$ ). Data are shown as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ).

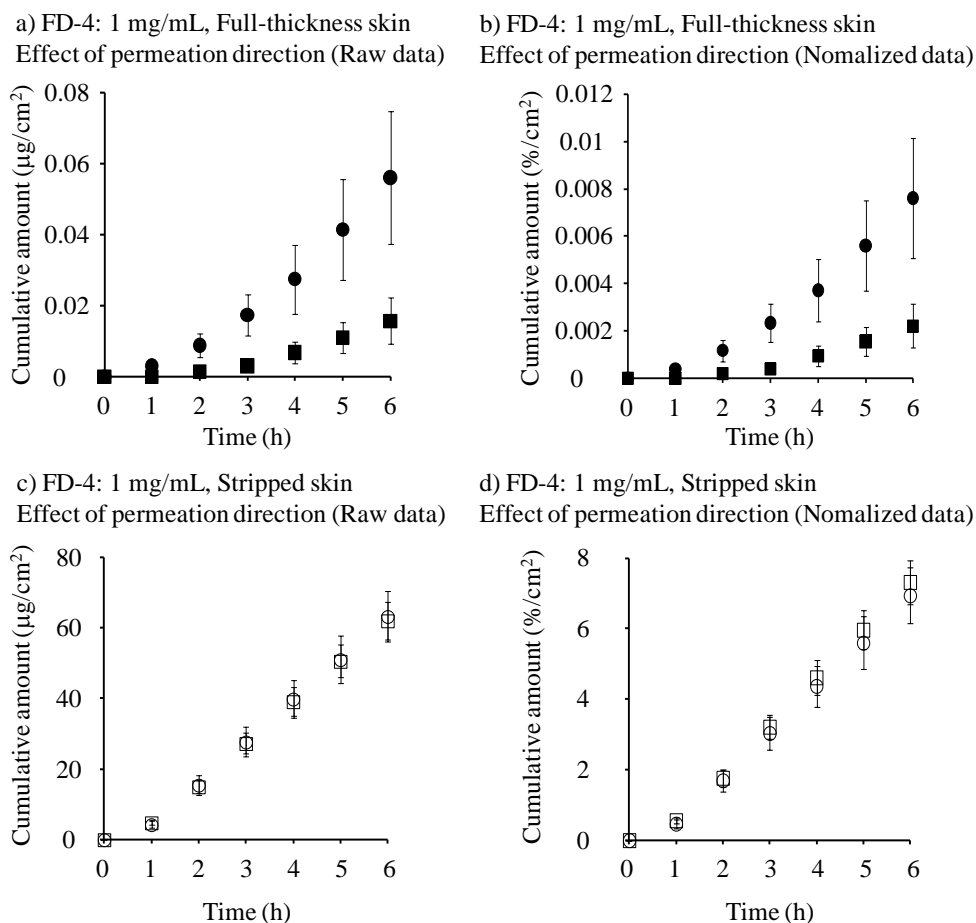


Fig. 23 Time course of changes in the cumulative amounts of FD-4 permeated through full-thickness (a, b) skin and stripped skin (c, d). (a) and (c) are raw data ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), and (b) and (d) are normalized data ( $\%/ \text{cm}^2$ ). Symbols: full-thickness skin permeation in the epidermis-to-dermis direction from PBS (●), full-thickness skin permeation in the dermis-to-epidermis direction from PBS (■), stripped skin permeation in the epidermis-to-dermis direction from PBS (○), stripped skin permeation in the dermis-to-epidermis direction from PBS (□). Data are shown as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ).

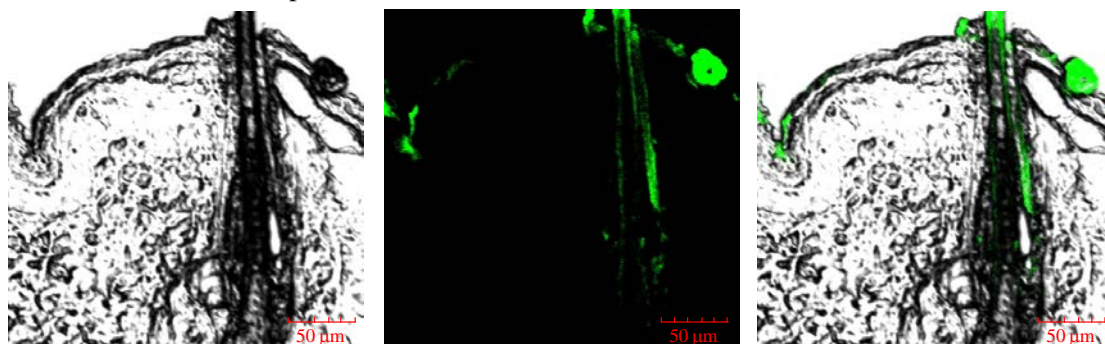
FD-4の場合は、透過ルートが親油性の低分子化学物質と異なることが皮膚透過性に影響していると考えた。化学物質の分子量が500 Da以上になると皮膚透過性は極端に低くなる<sup>55)</sup>。FD-4は、この分子量の約9倍の大きさ(*M.W.* 4400)であるにも関わら

ず、Fig. 23a, bに示すように皮膚透過が見られたが、毛嚢のない三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた場合のFD-4の透過は見られないと報告されている<sup>76)</sup>。よって、FD-4の主な皮膚透過ルートは毛嚢であると仮定できる。Figure 24に透過実験終了後の皮膚切片画像を示す。Figure 24aはFD-4の表皮→真皮透過実験後の切片画像である。角層部位に蛍光は観察されなかったが、毛嚢では観察された。また、Fig. 24bに真皮→表皮透過実験後の切片画像を示す。Figure 24aと同様に、角層部位の蛍光は観察されなかったが、毛嚢および生きた表皮・真皮では観察された。すなわち、FD-4の皮膚透過ルートは角層ではなく、毛嚢であると考えられる。なお、透過実験終了後の皮膚を肉眼で観察したところ、真皮→表皮透過実験後の真皮の裏側にははっきりと蛍光色を示していたが、表皮→真皮透過実験後の角層表面では見られなかった。以上より、真皮→表皮皮膚透過速度は、表皮→真皮皮膚透過速度より低い、皮膚中濃度は表皮適用より真皮適用の方が高くなっていると考えられた。この原因は、Fig. 16e, fで説明できる。ただし、FD-4の場合は、基剤-角層間の分配が小さく、基剤-真皮間の分配が大きいことも考慮しなければならない。

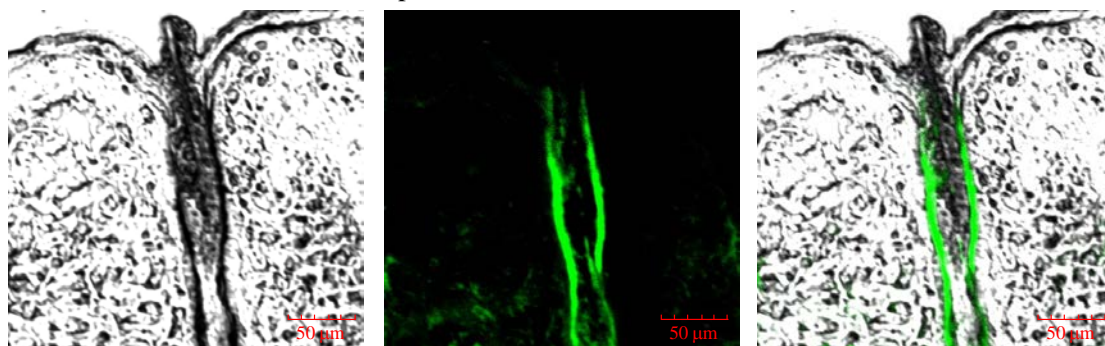
また、ISMNでも、Fig. 22においてFD-4と同様の結果が得られたことから、親水性化学物質の場合、分子量に関わらず化学物質の透過性には毛嚢の寄与が高く、その表皮→真皮と真皮→表皮透過速度の違いに関係していることが考えられた。



a) FD-4, Permeation of epidermis→dermis



b) FD-4, Permeation of dermis→epidermis



Visible light image

Fluorescence image

Merged image

Fig. 24 Skin section image after the permeation experiment in epidermis-to-dermis (a) and dermis-to-epidermis directions (b).

そこで、ISMNの透過における毛嚢の寄与と透過の方向性との関係性を評価する目的で、ヒト皮膚およびヘアレスラット皮膚透過速度の比較を行った。なお、ヒト皮膚として、毛嚢の影響が顕著だと考えられるヒト頭部皮膚を用いた。その結果をFig. 25に示す。数多くの頭部皮膚が得られなかったため、例数は1である。ヒト腹部皮膚を介したISMNの分配係数は5.0、ヒト頭部皮膚を介したISMNの分配係数は7.1であったことから、親水性のISMNでは、毛嚢に多く分布し、その結果として皮膚表面の毛嚢密度が大きいヒト頭部皮膚を介したISMNの透過では、毛嚢の寄与が大きいと考えられた。また、真皮→表皮ヒト皮膚透過速度は、表皮→真皮ヒト皮膚透過速度よりも低く、ヘアレスラット皮膚透過速度と同様の結果を示した。

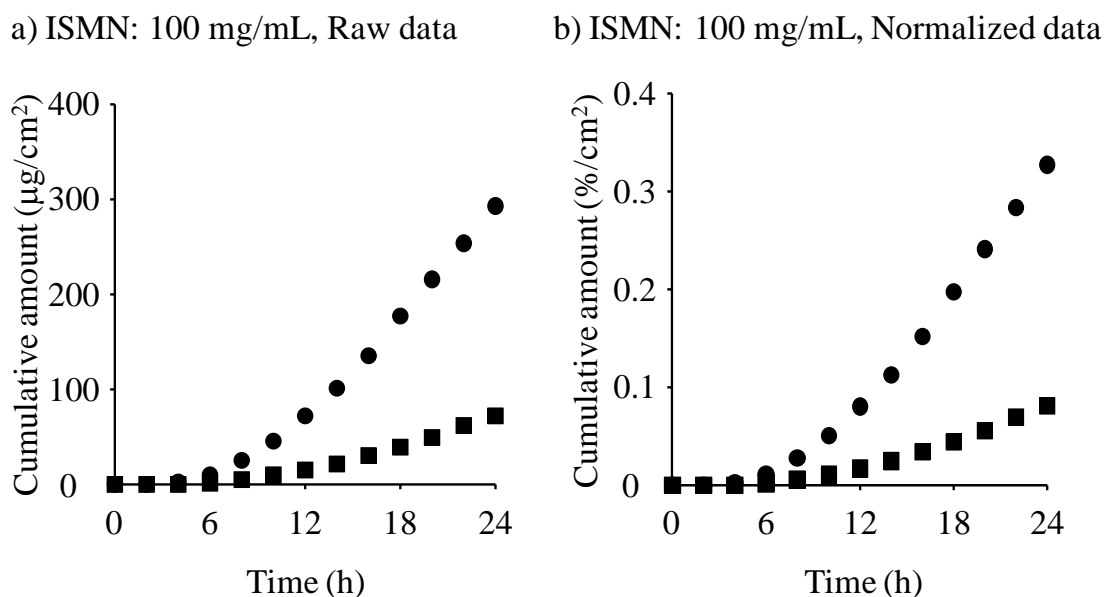


Fig. 25 Time course of changes in the cumulative amount of ISMN that permeated through human scalp skin from raw data (a) and normalized data (b). Symbols: full-thickness skin permeation in the epidermis-to-dermis direction from PBS (●), full-thickness skin permeation in the dermis-to-epidermis direction from PBS (■). ( $n = 1$ ).

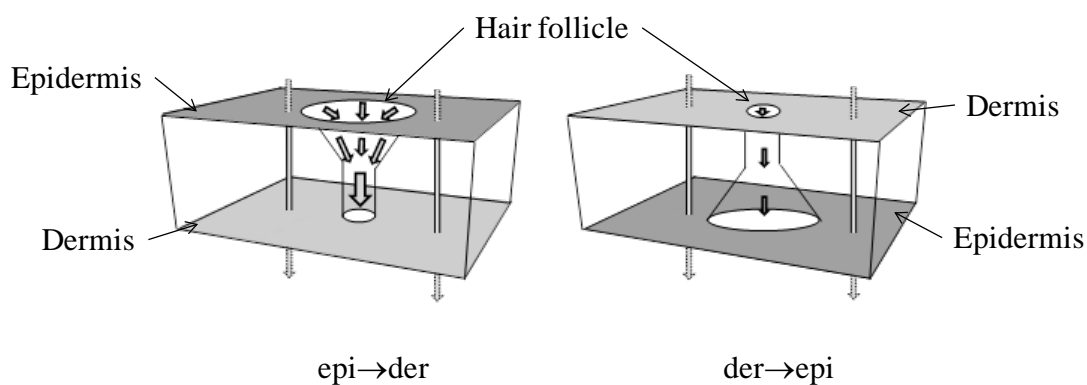
前述したように、化学物質の分子量が500 Da以上になると、ほとんど皮膚を通らないことが知られている<sup>55)</sup>。しかし、透過性は低いものの分子量が500 Da以上でも皮膚を透過するものも報告されており、これには皮膚に存在する毛嚢の寄与が考えられている<sup>34,77-83)</sup>。そのため、近年では親水性化学物質の皮膚透過を考慮する際、毛嚢ルートを含めた、付属器官ルートの役割も考慮しなくてはならない。

FD-4およびISMNのfull-thickness skinを介する透過性の方向性には毛嚢の上下非対照の構造が大きく影響していると仮説をたてた。Figure 26にその仮説に基づく親油性化学物質と親水性化学物質の角層透過のモデル、すなわち、conical pore permeation modelを示す。図に示すように、表皮側の毛嚢開口部は大きく空いているが、角層深部になるにつれ毛嚢が狭くなり、漏斗状の孔を形成している。つまり、表皮

→真皮透過の場合は、ドナー溶液に接する面に大きな孔が存在するため、その孔から化学物質が浸透することになるが、真皮→表皮透過の場合は、孔径部の小さい方から化学物質が浸透することになる。親水性化学物質は、親油性の角層実質部をほとんど透過せずに、主に毛嚢部を透過すると考えられる (Fig. 26a)。その際、大きな孔面積を示す表皮側から真皮方向への透過速度は、小さな孔面積を示す真皮側から表皮方向への透過速度に比べて高くなると考えた。なお、親水性化学物質だけでなく親油性化学物質も毛嚢を透過するはずであるが (Fig. 26b)、親油性化学物質は、親水性化学物質に比べて角層実質の透過寄与が大きく、また、皮膚に存在する毛嚢の面積は、皮膚全体の0.1%しかないため、親油性化学物質の皮膚透過に及ぼす毛嚢の影響は極めて小さいのではないかと考えた。

このようなモデルに従う透過の場合、皮膚中濃度は第2章で予測したようにはならない。すなわち、 $x$ 軸の深さ方向だけでなく、 $y$ - $z$ 軸方向での濃度分布を考慮する必要がある。毛嚢の周辺は、より濃度が高くなることが予想でき、そのような分布は育毛剤などの適用によいかもしい。今後、3次元方向の皮膚中濃度予測式を構築、または、付属器官ルートを考慮した皮膚中濃度予測式を構築し、評価することができれば、第1章、第2章で評価した物理化学的性質を有する化学物質だけでなく、より広範囲の物理化学的性質を持つ化学物質の皮膚中濃度予測を行うことができると考えられた。

a) Permeation of hydrophilic substance



b) Permeation of lipophilic substance

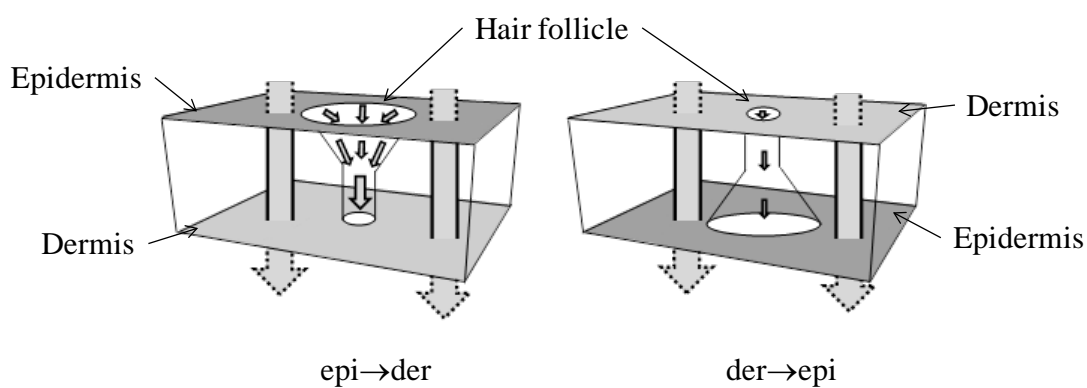


Fig. 26 Conical pore model of permeation pathway of hydrophilic compounds (a) and lipophilic compounds (b) through skin.

## 第4節 小括

PeP の場合、3% EtOH を加えること、MP の場合、透過実験終了後のドナー化学物質で補正することで皮膚透過速度理論と実測した皮膚透過速度が一致したことから、実験方法の工夫を行えば、第 1 章、第 2 章の方法で皮膚中濃度の予測が可能であると考えられた。すなわち、PeP と MP で観察された特異な皮膚透過速度は実験手技上の問題であると考えられた。ただし、MP のドナー溶液の急激な減少が皮膚中成分への吸着であったならば、第 1 章、第 2 章の方法では吸着を考慮していないので、皮膚中濃度を過小評価することになると考えられた。

一方、ISMN や FD-4 では、経角層ルートよりは、経付属器官ルートの寄与を考慮しなければならない。したがって、ISMN や FD-4 の皮膚中濃度予測は、第 1 章、第 2 章の方法で本質的に予測できない。

以上より、第1章、第2章で構築した皮膚中濃度予測は、分子量が500 Da以下で、 $\log K_{ow}$ が0以上の化学物質に有効的に用いることができると考えられた。一方、分子量が500 Da以上である場合や、 $\log K_{ow}$ が0以下の化学物質の皮膚中濃度予測の場合、 $x$ 軸の深さ方向だけでなく、 $y$ - $z$ 軸方向での濃度分布を考慮する必要が生じる。今後、3次元方向の皮膚中濃度予測式を構築、または、付属器官ルートを考慮した皮膚中濃度予測式を構築し、評価することができれば、広範囲の物理化学的性質を持つ化学物質の皮膚中濃度予測を行うことができると考えられた。

## 結論

外用医薬品や化粧品の有効性や安全性を確保するためには、薬物や化粧品有効成分のみならず添加原料の皮内動態(皮膚中各部位での濃度経時変化)を正確に把握し、目的に応じた皮膚中濃度測定が必要となる。また、非意図的に皮膚に暴露される化学物質についても安全性予測が大変重要となる。しかしながら、皮膚に暴露する全ての化学物質の測定を行うには、多くのヒト皮膚や動物皮膚が必要になるばかりか、多大な時間も要する。もちろん、ヒトを用いた *in vivo* での皮膚中濃度測定は難しく、動物実験を行うにも動物福祉の観点から動物実験をできる限り行わないことが望ましい。したがって、皮膚中濃度を迅速かつ実験動物を用いずに評価するには、化学物質の物理化学的性質を用いた予測法の確立が有用であると考えられる。

そこで、本研究では、Fick の拡散則から皮膚中濃度予測式を算出し、皮膚中濃度予測式が有用であるか検討し、理論に基づく皮膚中濃度予測の可能性について調べた。第 1 章では、均一な 1 層膜であるシリコーン膜を用いて、化学物質の膜透過速度が定常状態時の膜中平均濃度を **concentration-distance profile** から予測した。次に皮膚を用いて皮膚中平均濃度を 1 層膜もしくは角層と生きた表皮・真皮の 2 層膜と仮定した時の **concentration-distance profile** から予測した。さらに、シリコーン膜中濃度から皮膚中濃度が予測可能であるか検討した。第 2 章では、皮膚中各深度(目的部位)濃度を **concentration-distance profile** から予測可能であるか検討した。第 1 章、第 2 章では、比較的皮膚を通りやすいと考えられる物理化学的性質を持つ化学物質を選択し検討を行った。第 3 章の研究では、第 1 章、第 2 章の皮膚中濃度予測式がより広範囲の化学物質に利用であるか検討を行い、予測できない物理化学的性質を有する化学物質に関しては、その問題点を検討した。

## 1. 皮膚透過パラメータを用いた皮膚中平均濃度の予測

シリコーン膜およびヘアレスラット摘出皮膚を均一な 1 層膜と仮定して、透過挙動データより透過パラメータを計算し、得られた値から皮膚および膜中濃度を求めた。その結果、シリコーン膜の場合、膜中濃度の実測値と計算値はほぼ一致したが、full-thickness skin の場合、実測値と計算値が大きく異なった。しかし、full-thickness skin を角層と表皮・真皮から成る 2 層膜と仮定して、2 層膜拡散式を用いて得られた透過パラメータより計算すると、皮膚中濃度の計算値は実測値とほぼ一致した。以上より透過パラメータを計算することで、皮膚・膜中濃度を予測することが可能であると示唆された。また、種々モデル化学物質のシリコーン膜透過パラメータより計算した膜中濃度と皮膚中濃度の実測値を比較した結果、一定の相関性を得ることができた。これらのことから、Fick の拡散則から算出した皮膚中平均濃度予測式が有用であると考えられた。また、新規試験化学物質のシリコーン膜透過性から、その化学物質のラットやヒト皮膚中濃度が推定できると考えられた。

## 2. 皮膚透過パラメータを用いた皮膚各深度における濃度の予測

ブタ外耳皮膚透過挙動データより透過パラメータを計算し、得られた値から角層および生きた表皮・真皮各深度における化学物質濃度を求めた。その結果、角層および生きた表皮・真皮各深度における濃度の実測値は、得られた計算値とほぼ一致した。

皮膚局所作用を期待した外用医薬品や化粧品の有効性・安全性予測は、皮膚中濃度が重要であるが、その皮膚中での作用部位は様々である。例えば、色素沈着の原因であるメラニン生成は、生きた表皮の基底層にあるメラノソームと呼ばれる細胞小器官で行われる。したがって、メラニン生成を阻害するアルブチンやコウジ酸の有効性評価は、生きた表皮中濃度を測定する必要がある。また、抗しわ効果を示すビタミン A

関連化学物質(レチノイン、レチノイン酸)やグリコール酸の有効性は、真皮中濃度に左右される。これらのことから、第2章で算出した皮膚中各深度における濃度を予測する式は大変有用であると考えられた。さらに、皮膚中濃度から求めた角層と生きた表皮真皮の透過抵抗比と皮膚透過性から求めた角層と生きた表皮真皮の透過抵抗比が一致したことから、concentration-distance profile を用いた皮膚透過性や皮膚中濃度予測は非常に有用であると考えられた。

### 3. 単純な Fick の拡散則では説明がつかない化学物質の皮膚透過パラメータと皮膚中濃度の予測

親油性の高い PeP の場合、PBS 溶液からの full-thickness skin 透過速度より stripped skin 透過速度が低くなった。3% EtOH を加えることで透過速度が等しくなったことから、stripping した皮膚界面の抵抗が原因していると考えられた。MP では表皮→真皮透過速度が真皮→表皮透過速度より高かった。真皮側では MP が多量に皮膚移行して有効濃度が減少していることが確認され、これを補正すると透過方向による差は解消された。したがって、実験方法さえきちんと工夫すれば、これらの化学物質の皮膚中濃度は十分予測できると考えられた。しかし、親水性化学物質である FD-4 や ISMN でも表皮→真皮透過速度が真皮→表皮透過速度より高かったが、透過実験終了後のドナー化学物質で補正しても透過速度が異なったことから、このような親水性化学物質の場合、第1章や第2章で用いた予測法を用いることができないことが明らかとなった。その原因として毛嚢などの細孔透過ルートが原因であると考えられ、conical pore permeation model を提案した。今後、3次元方向の皮膚中濃度予測式を構築、または、付属器官ルートを考慮した皮膚中濃度予測式を構築し、評価することができれば、広範囲の物理化学的性質を持つ化学物質の皮膚中濃度予測を行うことができると考えられた。



以上より、第1章、第2章で構築した皮膚中濃度予測は、分子量が500 Da以下で、 $\log K_{o/w}$ が0以上の化学物質に有効的に用いることができると考えられた。ただし、単純な Fick の拡散則では説明がつかない皮膚透過速度を示す化学物質の場合、例えば3% EtOH をドナー溶液に加えて界面抵抗を弱めることや透過実験終了後のドナー中の化学物質濃度を正確に測定する等の実験手技上の工夫を行う必要があると考えられた。

一方、分子量が500 Da以上で、 $\log K_{o/w}$ が0以下の化学物質の皮膚中濃度予測の場合、 $x$  軸の深さ方向だけでなく、 $y$ - $z$  軸方向での濃度分布を考慮する必要が生じる。広範囲の物理化学的性質を持つ化学物質の皮膚中濃度予測を行うためには、3次元での解析を行うことができる方法論の確立が必要であると考えられた。

## 謝辞

本研究に際し終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました城西大学薬学部薬粧品動態制御学講座教授 杉林 堅次 先生に厚く御礼申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり終始有益な、御指導、御助言を賜りました城西大学薬学部薬粧品動態制御学講座助教 藤堂 浩明 先生、城西大学招聘教授 Konstanty Wierzba 先生、東海大学研究員 日野(畑中) 朋美 先生、城西国際大学准教授 森 健二 先生に心から感謝の意を表します。

さらに、本論文作成にあたり、ご教示を頂きました城西大学薬学部毒性学講座教授 川嶋 洋一 先生、薬品物理化学講座教授 関 俊暢 先生に深謝いたします。

最後に、本研究の実施に御協力いただきました、城西大学薬学部薬粧品動態制御学講座助手 Wesam R Kadhum 先生、戸田(大和田) 容子 修士、菊池 啓介 学士をはじめとする関係諸氏に感謝いたします。

## 引用文献

- 1) Holford N.H., Sheiner L.B., Understanding the dose-effect relationship: clinical applications of pharmacokinetic-pharmacodynamic models, *Clin. Pharmacokinet.*, **6**, 429-453 (1981).
- 2) Kano S., Sugibayashi K., Kinetic analysis on the skin disposition of cytotoxicity as an index of skin irritation produced by cetylpyridinium chloride: comparison of *in vitro* data using a three-dimensional cultured human skin model with *in vivo* results in hairless mice, *Pharm. Res.*, **23**, 329-335 (2006).
- 3) Huffman D.H., Crow J.W., Pentikainen P., Azarnoff D.L., Association between clinical cardiac status, laboratory parameters, and digoxin usage, *Am. Heart J.*, **91**, 28-34 (1976).
- 4) Sheiner L.B., Rosenberg B., Marathe W., Estimation of population characteristics of pharmacokinetic parameters from routine clinical data, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **5**, 445-479 (1977).
- 5) Vozech S.R., Hillman R., Wandell M., Ludden T., Sheiner L., Computer-assisted drug assay interpretation based on Bayesian estimation of individual pharmacokinetics: application to lidocaine, *Ther. Drug Monit.*, **7**, 66-75 (1985).
- 6) Sato K., Oda T., Sugibayashi K., Morimoto Y., Estimation of blood concentration of drugs after topical application from *in vitro* skin permeation data. I. Prediction by convolution and confirmation by deconvolution, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2232-2238 (1988).
- 7) Sato K., Oda T., Sugibayashi K., Morimoto Y., Estimation of blood concentration of drugs after topical application from *in vitro* skin permeation data. II. Approach by

- using diffusion model and compartment model, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2624-2632 (1988).
- 8) Hatanaka T., Katayama K., Koizumi T., Sugibayashi K., Morimoto Y., *In vitro-in vivo* correlation of percutaneous absorption: isosorbide dinitrate and morphine hydrochloride, *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 826-830 (1994).
- 9) Kiistala U., Suction blister device for separation of viable epidermis from dermis, *J. Invest. Dermatol.*, **50**, 129-137 (1968).
- 10) Surber C., Wilhelm K.P., Bermann D., Maibach H.I., *In vivo* skin penetration of acitretin in volunteers using three sampling techniques, *Pharm. Res.*, **10**, 1291-1294 (1993).
- 11) Pershing L.K., Silver B.S., Krueger G.G., Shah V.P., Skelley J.P., Feasibility of measuring the bioavailability of topical betamethasone dipropionate in commercial formulations using drug content in skin and a skin blanching bioassay, *Pharm. Res.*, **9**, 45-51 (1992).
- 12) Rougier A., Dupuis D., Lotte C., Roguet R., Schaefer H., *In vivo* correlation between stratum corneum reservoir function and percutaneous absorption, *J. Invest. Dermatol.*, **81**, 275-278 (1983).
- 13) N'Dri-Stempfer B., Navidi W.C., Guy R.H., Bunge A.L., Improved bioequivalence assessment of topical dermatological drug products using dermatopharmacokinetics, *Pharm. Res.*, **26**, 316-328 (2009).
- 14) Lodén M., Ungerth L., Serup J., Changes in European legislation make it timely to introduce a transparent market surveillance system for cosmetics, *Acta Derm. Venereol.*, **87**, 485-492 (2007).
- 15) Kolar R., Animal experimentation, *Sci. Eng. Ethics.*, **12**, 111-122 (2006).

- 16) Spielmann H., Animal use in the safety evaluation of chemicals: Harmonization and emerging needs, *ILAR J.*, (Suppl.), S11-S17 (2002).
- 17) Hammell D.C., Stolarczyk E.I., Klausner M., Hamad M.O., Crooks P.A., Stinchcomb A.L., Bioconversion of naltrexone and its 3-O-alkyl-ester prodrugs in a human skin equivalent, *J. Pharm. Sci.*, **94**, 828-836 (2005).
- 18) Netzlaff F., Kaca M., Bock U., Haltner-Ukomadu E., Meiers P., Lehr C.M., Schaefer U.F., Permeability of the reconstructed human epidermis model Episkin in comparison to various human skin preparations, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **66**, 127-34 (2007).
- 19) Gabbanini S., Lucchi E., Carli M., Berlini E., Minghetti A., Valgimigli L., *In vitro* evaluation of the permeation through reconstructed human epidermis of essentials oils from cosmetic formulations, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **50**, 370-376 (2009).
- 20) Kano S., Todo H., Sugie H., Fujimoto H., Nakada K., Tokudome Y., Hashimoto F., Sugibayashi K., Utilization of reconstructed cultured human skin models as an alternative skin for permeation studies of chemical compounds, *AATEX.*, **15**, 61-70 (2010).
- 21) Potts R.O., Guy R.H., Predicting skin permeability, *Pharm. Res.*, **9**, 663-669 (1992).
- 22) Ottaviani G., Martel S., Carrupt P.A., *In silico* and *in vitro* filters for the fast estimation of skin permeation and distribution of new chemical entities, *J. Med. Chem.*, **50**, 742-748 (2007).
- 23) Naegel A., Hansen S., Neumann D., Lehr C.M., Schaefer U.F., Wittum G., Heisig M., *In-silico* model of skin penetration based on experimentally determined input parameters. Part II: mathematical modelling of *in-vitro* diffusion experiments. Identification of critical input parameters, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **68**, 368-379

- (2008).
- 24) Lian G., Chen L., Han L., An evaluation of mathematical models for predicting skin permeability, *J. Pharm. Sci.*, **97**, 584-598 (2008).
- 25) Fujiwara S., Yamashita F., Hashida M., QSAR analysis of interstudy variable skin permeability based on the "latent membrane permeability" concept, *J. Pharm. Sci.*, **92**, 1939-1946 (2003).
- 26) Geinoz S., Guy R.H., Testa B., Carrupt P.A., Quantitative structure-permeation relationships (QSPeRs) to predict skin permeation: a critical evaluation, *Pharm. Res.*, **21**, 83-92 (2004).
- 27) Hatanaka T., Inuma M., Sugibayashi K., Morimoto Y., Prediction of skin permeability of drugs. I. Comparison with artificial membrane, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 3452-3459 (1990).
- 28) Leveque N., Raghavan S.L., Lane M.E., Hadgraft J., Use of a molecular form technique for the penetration of supersaturated solutions of salicylic acid across silicone membranes and human skin *in vitro*, *Int. J. Pharm.*, **318**, 49-54 (2006).
- 29) Geinoz S., Rey S., Boss G., Bunge A.L., Guy R.H., Carrupt P.A., Reist M., Testa B., Quantitative structure: Permeation relationships for solute transport across silicone membranes, *Pharm. Res.*, **19**, 1622-1629 (2002).
- 30) Ohmori S., Hayashi T., Kawase M., Saito S., Sugibayashi K., Morimoto Y., Transdermal delivery of the potent analgesic dihydroetorphine: kinetic analysis of skin permeation and analgesic effect in the hairless rat, *J. Pharm. Pharmacol.*, **52**, 1437-1449 (2000).
- 31) Sato K., Mitsui N., Hasegawa T., Sugibayashi K., Morimoto Y., Potential usefulness of solubility index for prediction of the skin permeation rate of 5-ISMN

- from pressure-sensitive adhesive tape, *J. Control. Release*, **73**, 269-277 (2001).
- 32) Sugibayashi K., Hayashi T., Matsumoto K., Hasegawa T., Utility of a three-dimensional cultured human skin model as a tool to evaluate the simultaneous diffusion and metabolism of ethyl nicotinate in skin, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **19**, 352-362 (2004).
- 33) Hada N., Hasegawa T., Takahashi H., Ishibashi T., Sugibayashi K., Cultured skin loaded with tetracycline HCl and chloramphenicol as dermal delivery system: Mathematical evaluation of the cultured skin containing antibiotics, *J. Control. Release*, **108**, 341-350 (2005).
- 34) Scheuplein R.J., Mechanism of percutaneous absorption: Transient diffusion and the relative importance of various routes of skin penetration. II. Transient diffusion and the relative importance of various routes of skin penetration, *J. Invest. Dermatol.*, **48**, 79-88 (1967).
- 35) Herkenne C., Naik A., Kalia Y.N., Hadgraft J., Guy R.H., Ibuprofen transport into and through skin from topical formulations: *In vitro-in vivo* comparison, *J. Invest. Dermatol.*, **127**, 135-142 (2007).
- 36) Flynn G.L., Yalkowsky S.H., Roseman T.J., Mass transport phenomena and models: theoretical concepts, *J. Pharm. Sci.*, **63**, 479-510 (1974).
- 37) Fedors R.F., A method for estimating both the solubility parameters and molar volumes of liquids, *Polym. Eng. Sci.*, **14**, 147-154 (1971).
- 38) Aspe E., Guy R.H., Lee W.A., Kennedy J.A., Visor G.C., Ennis R.D., Optimization of *in vitro* flux through hairless mouse skin of cidofovir, a potent nucleotide analog, *J. Pharm. Sci.*, **84**, 750-754 (1995).
- 39) Higo N., Hinz R.S., Lau D.T.W., Benet L.Z., Guy R.H., Cutaneous metabolism of

- nitroglycerin *in vitro*. II. Effects of skin condition and penetration enhancement, *Pharm. Res.*, **9**, 303-306 (1992).
- 40) Shah H.S., Tojo K., Chien Y.W., Transdermal controlled delivery of verapamil: characterization of *in vitro* skin permeation, *Int. J. Pharm.*, **86**, 167-173 (1992).
- 41) Tamura M., Sueishi T., Sugibayashi K., Morimoto Y., Juni K., Hasegawa T., Kawaguchi T., Metabolism of testosterone and its ester derivatives in organotypic coculture of human dermal fibroblasts with differentiated epidermis, *Int. J. Pharm.*, **131**, 263-271 (1996).
- 42) Ahmed S., Imai T., Otagiri M., Evaluation of stereoselective transdermal transport and concurrent cutaneous hydrolysis of several ester prodrugs of propranolol: mechanism of stereoselective permeation, *Pharm. Res.*, **13**, 1524-1529 (1996).
- 43) Sugibayashi K., Hosoya K., Morimoto Y., Higuchi W.I., Effect of the absorption enhancer, Azone, on the transport of 5-fluorouracil across hairless rat skin, *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**, 578-580 (1985).
- 44) Morimoto Y., Sugibayashi K., Hosoya K., Higuchi W.I., Penetration enhancer effect of Azone on the transport of 5-fluorouracil across hairless rat skin, *Int. J. Pharm.*, **32**, 31-38 (1986).
- 45) LaPack M.A., Tou J.C., McGuffin V.L., Enke C.G., The correlation of membrane permselectivity with Hildebrand solubility parameters, *J. Membrane Sci.*, **86**, 263-280 (1994).
- 46) Dias M., Hadgraft J., Lane M.E., Influence of membrane-solvent-solute interactions on solute permeation in model membranes, *Int. J. Pharm.*, **336**, 108-114 (2007).
- 47) Kajimoto H., Sugibayashi K., Morimoto Y., Solubility and membrane permeability of various low molecular weight drugs, *Yakuzaigaku*, **55**, 127-133 (1995).



- 48) Sugibayashi K., Todo H., Oshizaka T., Owada Y., Mathematical model to predict skin concentration of drugs: toward utilization of silicone membrane to predict skin concentration of drugs as an animal testing alternative, *Pharm. Res.*, **27**, 134-142 (2010).
- 49) Maibach H.I., Measuring the skin, *Springer*, (2004).
- 50) Seiji M., Fitzpatrick T.B., Birbeck M.S., The melanosome: a distinctive subcellular particle of mammalian melanocytes and the site of melanogenesis, *J. Invest. Dermatol.*, **36**, 243-252 (1961).
- 51) Maeda K., Fukuda M., Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **276**, 765-769 (1996).
- 52) Mishima Y., Hatta S., Ohyama Y., Inazu M., Induction of melanogenesis suppression: cellular pharmacology and mode of differential action, *Pigment. Cell Res.*, **1**, 367-374 (1988).
- 53) Kligman L.H., The ultraviolet-irradiated hairless mouse: a model for photoaging, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **21**, 623-631 (1989).
- 54) Van Scott E.J., Ditre C.M., Yu R.J., Alpha-hydroxyacids in the treatment of signs of photoaging, *Clin. Dermatol.*, **14**, 217-226 (1996).
- 55) Bos J.D., Meinardi M.M., The 500 dalton rule for the skin permeation of chemical compounds and drugs, *Exp. Dermatol.*, **9**, 165-169 (2000).
- 56) Leo A., Hansch C., Linear free-energy relationships between partitioning solvent systems, *J. Org. Chem.*, **36**, 1539-1544 (1971).
- 57) Oshizaka T., Todo H., Sugibayashi K., Effect of direction (epidermis-to-dermis and dermis-to-epidermis) on the permeation of several chemical compounds through full-thickness skin and stripped skin, *Pharm. Res.*, **29**, 2477-2488 (2012).

- 58) Feldmann R.J., Maibach H.I., Regional variation in percutaneous penetration of <sup>14</sup>C cortisol in man, *J. Invest. Dermatol.*, **48**, 181-183 (1967).
- 59) Ogiso T., Shiraki T., Okajima K., Tanino T., Iwaki M., Wada T., Transfollicular drug delivery: penetration of drugs through human scalp skin and comparison of penetration between scalp and abdominal skins *in vitro*, *J. Drug Target.*, **10**, 369-378 (2002).
- 60) Kokubo T., Sugibayashi K., Morimoto Y., Mathematical models describing the drug release kinetics from pressure sensitive adhesive matrix, *J. Control. Release*, **20**, 3-12 (1992).
- 61) Anissimov Y.G., Roberts M.S., Diffusion modeling of percutaneous absorption kinetics: 2. Finite vehicle volume and solvent deposited solids, *J. Pharm. Sci.*, **90**, 504-520 (2001).
- 62) Hadgraft J., Ridout G., Development of model membranes for percutaneous absorption measurements. I. Isopropyl myristate, *Int. J. Pharm.*, **39**, 149-156 (1987).
- 63) Albery W.J., Burke J.F., Leffler E.B., Hadgraft J., Interfacial transfer studied with a rotating diffusion cell, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1*, **72**, 1618-1626 (1976).
- 64) Hadgraft J., Calculations of drug release rates from controlled release devices. The slab., *Int. J. Pharm.*, **2**, 177-194 (1979).
- 65) Tojo K., Hydrodynamic characteristics of an *in vitro* drug permeation cell, *Ind. Eng. Chem. Fundamen.*, **24**, 368-373 (1985).
- 66) Henning A., Schaefer U.F., Neumann D., Potential pitfalls in skin permeation experiments: Influence of experimental factors and subsequent data evaluation, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **72**, 324-331 (2009).
- 67) Sugibayashi K., Nemoto M., Morimoto Y., Effect of several penetration enhancers

- on the percutaneous absorption of indomethacin in hairless rats, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1519-1528 (1988).
- 68) Kim Y.C., Park J.H., Ludovice P.J., Prausnitz M.R., Synergistic enhancement of skin permeability by N-lauroylsarcosine and ethanol, *Int. J. Pharm.*, **352**, 129-138 (2008).
- 69) Suhonen T.M., Bouwstra J.A., Urtti A., Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations, *J. Control. Release*, **59**, 149-161 (1999).
- 70) Quinn J.A., Jeanin P.G., Interfacial resistance: Diffusion into a laminar liquid-liquid jet, *Chem. Eng. Sci.*, **15**, 243-250 (1961).
- 71) Scott E.J., Tung L.H., Drickamer H.G., Diffusion through an interface, *J. Chem. Phys.*, **19**, 1075-1078 (1951).
- 72) Li Q., Tsuji H., Kato Y., Sai Y., Kubo Y., Tsuji A., Characterization of the transdermal transport of flurbiprofen and indomethacin, *J. Control. Release*, **110**, 542-556 (2006).
- 73) Ito K., Kato Y., Tsuji H., Nguyen H.T., Kubo Y., Tsuji A., Involvement of organic anion transport system in transdermal absorption of flurbiprofen, *J. Control. Release*, **124**, 60-68 (2007).
- 74) Sugibayashi K., Hosoya K., Morimoto Y., Higuchi W.I., Effect of the absorption enhancer, Azone, on the transport of 5-fluorouracil across hairless rat skin, *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**, 578-580 (1985).
- 75) Morimoto Y., Sugibayashi K., Hosoya K., Higuchi W.I., Penetration enhancer effect of Azone on the transport of 5-fluorouracil across hairless rat skin, *Int. J. Pharm.*, **32**, 31-38 (1986).

- 76) Todo H., Kimura E., Yasuno H., Tokudome Y., Hashimoto F., Sugibayashi K.,  
Permeation pathway of macromolecules and nanospheres through skin, *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 1394-1399 (2010).
- 77) Du Plessis J., Egbaria K., Ramachandran C., Weiner N.D., Topical delivery of  
liposomally encapsulated gamma-interferon, *Antiviral Res.*, **18**, 259-265 (1992).
- 78) Feldmann J.R., Maibach H.I., Regional variation in percutaneous penetration of <sup>14</sup>C  
cortisol in man, *J. Invest. Dermatol.*, **48**, 181-183 (1967).
- 79) Maibach H.I., Feldmann J.R., Hilby T.H., Serat W.F., Regional variation in  
percutaneous penetration in man. Pesticides, *Arch. Environ. Health*, **23**, 208-211  
(1971).
- 80) Illel B., Formulation for transfollicular drug administration: some recent advances,  
*Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **14**, 207-219 (1997).
- 81) Wosicka H., Cal K., Targeting to the hair follicles: Current status and potential, *J. Dermatol. Sci.*, **57**, 83-89 (2010).
- 82) Lauer A.C., Lieb L.L., Ramachandran C., Flynn G.L., Weiner N.D., Transfollicular  
drug delivery, *Pharm. Res.*, **12**, 179-186 (1995).
- 83) Ramachandran C., Fleisher D., Transdermal delivery of drug for the treatment of  
bone diseases, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **42**, 197-223 (2000).